

Санкт-Петербургский Государственный университет  
Биологический факультет  
Кафедра микробиологии

Остроухова Мария Владимировна

**Альтернативные оксидазы  
*Chlamydomonas reinhardtii*: регуляция в стрессовых  
условиях**

Выпускная квалификационная работа магистра  
(магистерская диссертация)

Работа выполнена в  
лаборатории адаптации микроорганизмов  
кафедры микробиологии  
Санкт-Петербургского Государственного  
университета  
(зав. лаб. – д.б.н., профессор Ермилова Е.В.)  
(зав. каф. - д.б.н., профессор Пиневи́ч А.В.)

Научный руководитель:  
д.б.н, профессор Ермилова Елена Викторовна

Санкт-Петербург

2017

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Альтернативная оксидаза как компонент электрон-транспортной цепи митохондрии.....	7
1.2. Характеристика альтернативных оксидаз (АОХ) высших растений.....	7
1.2.1. Структура и регуляция транскрипции АОХ-генов.....	7
1.2.2. Структура и механизмы регуляции активности АОХ белка.....	12
1.2.3. Функции АОХ.....	17
1.2.3.1. Роль АОХ в контроле метаболического гомеостаза.....	17
1.2.3.2. Роль АОХ при адаптации к стрессовым воздействиям.....	18
1.3. Характеристика альтернативных оксидаз (АОХ) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	21
1.3.1. Структура и регуляция транскрипции АОХ-генов.....	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	26
2.1. Объекты исследования.....	26
2.2. Условия культивирования.....	26
2.3. Количественный анализ экспрессии генов.....	28
2.3.1. Выделение тотальной РНК.....	28
2.3.2. Синтез одноцепочечной кДНК.....	29
2.3.3. ПЦР в режиме реального времени.....	29
2.4. Вестерн-блоттинг.....	31
2.5. Получение штамма со сниженным уровнем мРНК CRR1.....	32
2.5.1. Конструирование последовательностей олигонуклеотидов, специфичных к CRR1.....	32
2.5.2. Клонирование двухцепочечной ДНК для экспрессии искусственных микроРНК.....	33
2.5.3. Отбор amiRNA-клонов, содержащих вставку в ориентации, необходимой для экспрессии.....	34
2.5.4. Трансформация <i>C. reinhardtii</i> .....	36
2.6. Измерение дыхания клеток.....	37
2.7. Измерение активных форм кислорода (АФК).....	37
2.8. Анализ активности каталазы.....	38
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	39

3.1. Действие кадмия на синтез и активность альтернативной оксидазы АOX1.....	39
3.1.1. Действие кадмия на транскрипцию гена <i>AOX1</i> .....	39
3.1.2. Действие кадмия на уровни белка АOX1.....	41
3.1.3. Действие кадмия на АOX-зависимое дыхание .....	42
3.1.4. Действие кадмия на концентрацию внутриклеточных АФК и активность каталазы.....	43
3.2. Действие стрессоров на экспрессию гена <i>AOX2</i> .....	45
3.2.1. Действие аноксии на транскрипцию гена <i>AOX2</i> .....	45
3.2.2. Роль транскрипционного фактора CRR1 в контроле транскрипции гена <i>AOX2</i> .....	47
3.2.3. Действие дефицита меди на транскрипцию гена <i>AOX2</i> .....	49
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	51
4.1 Синтез и функционирование альтернативной оксидазы АOX1 в условиях стрессового воздействия.....	51
4.2 Регуляция экспрессии <i>AOX2</i> в стрессовых условиях.....	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
ВЫВОДЫ.....	56
БЛАГОДАРНОСТИ.....	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	58

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ** - аденозиндифосфат
- АОХ** - альтернативная оксидаза
- АТФ** - аденозинтрифосфат
- АФК** - активные формы кислорода
- БСА** - сывороточного альбумина
- ДТТ** - дитиотриэтол
- кДНК** – комплементарная ДНК
- НАДН** - никотинамид-адениндинуклеотид (восстановленная форма)
- НАДФ<sup>+</sup>** – никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (окисленная форма)
- НАДФН** - никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (восстановленная форма)
- ПААГ** - полиакриламидный гель
- ПЦР** - полимеразная цепная реакция
- ТЕТА** – триэтиленetetрамин
- ФМСФ** – фенилметилсульфонилфторид
- ЦТК** – цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)
- ЭДТА** - этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЭТЦ** – электрон-транспортная цепь
- DEPC** – диэтилпирокарбонат
- DMSO** –диметилсульфоксид
- dNTP** – дезоксинуклеотидтрифосфат
- ЕТ** - этилен
- H<sub>2</sub>DCF-DA** - 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетата
- JA** - жасмонат
- MnСОД** - магний-зависимая супероксиддисмутаза
- MPTP** - митохондриальная пора перехода проницаемости
- SA** – салициловая кислота
- SDS** - додецилсульфат натрия
- TEMED** – тетраметилэтилендиамин
- TIM** – транслоказы внутренней мембраны митохондрий
- TAP** - трис-ацетат-фосфатной среда
- ТОМ** - траслоказы внешней мембраны митохондрий

## ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтезирующие эукариотические микроорганизмы быстро и эффективно адаптируются к изменениям в окружающей среде. При этом, наличие у этой группы микроорганизмов митохондрий и хлоропластов предполагает необходимость координированного функционирования разных компартментов клеток и наличие компартмент-специфичных механизмов, обеспечивающих эффективную адаптацию к неблагоприятным факторам. Следует подчеркнуть, что в литературе практически не обсуждается роль митохондрий в процессах адаптации и тех компонентов митохондрий, которые обеспечивают защитно-адаптивные реакции фототрофных эукариотических микроорганизмов в ответ на разные по природе стрессоры. Последнее обстоятельство ограничивает существующие представления как о механизмах регуляции стрессовых ответов, так и свойствах белков, функционирующих в митохондриях. В связи с этим возникает необходимость изучения митохондриальных белков, которые выполняли бы функцию интеграции метаболического состояния клетки с действием внешних стрессоров.

Один из механизмов клеточной защиты связан с функционированием альтернативных оксидаз (АОХ), локализованных в митохондриях. Хотя АОХ выявлены у эукариотических микроорганизмов, растений и грибов, изучались они главным образом у высших растений (Vanlerberghe et al., 2013). У высших растений существует два типа генов, кодирующих альтернативные оксидазы: *АОХ1*, которые найдены у всех проанализированных представителей, и *АОХ2*, которые, по-видимому, ограничены только двудольными растениями (Polidoros et al., 2009). Альтернативные оксидазы растений представлены, как правило, многими белками. Так у *Arabidopsis* их пять: *АОХ1a*, *АОХ1b*, *АОХ1c*, *АОХ1d* и *АОХ2*. Столь многокомпонентная организация АОХ, безусловно, затрудняет анализ свойств каждого отдельного представителя. Предполагают, что у высших растений альтернативные оксидазы могут действовать как центральные регуляторы роста и развития, а также как интеграторы сигналов стрессовых условий (Clifton et al., 2006; Vanlerberghe, 2013). В геноме модельного микроорганизма *Chlamydomonas reinhardtii* выявлено два гена, *АОХ1* и *АОХ2*, которые локализованы в разных хромосомах (хромосомы 9 и 3, соответственно). Ген *АОХ1* *C. reinhardtii* расположен в генетическом кластере, участвующем в ассимиляции нитратов (Gerin et al., 2010; Molen et al., 2006; Quesada et al., 1993). Показано, что транскрипция *АОХ1* *C. reinhardtii* индуцируется нитратом и репрессируется аммонием, и *АОХ1*-белок вовлечен в контроль наиболее важных путей метаболизма микроорганизма (Gérin et al., 2010).

Особенно следует подчеркнуть, что подобная регуляция альтернативной оксидазы нитратом и аммонием уникальна для *C. reinhardtii*, а для высших растений характерна противоположная зависимость: активация аммонием и репрессия нитратом. Вместе с тем, роль АОХ1-белка в стрессовых условиях совершенно не ясна. Сотрудниками лаборатории впервые показана индукция *АОХ1* и возрастание доли альтернативного дыхания в условиях теплового стресса (Zalutskaya, Lapina, Ermilova, 2015). Однако неизвестно, какова роль АОХ1 в условиях гипертермии, и вовлечена ли эта альтернативная оксидаза у *C. reinhardtii* в защитно-адаптивные ответы микроорганизма на другие стрессовые воздействия. Более ранние исследования некоторых авторов по анализу транскрипции *АОХ1* в условиях незначительного снижения температуры (до 18°C) и окислительного стресса были проведены с использованием методов, которые не позволили корректно проанализировать регуляцию гена (Molen et al., 2006). Регуляция и роль второй альтернативной оксидазы микроорганизма, АОХ2, не изучалась совсем. В связи с этим возникает вопрос о возможном разграничении функций между продуктами генов *АОХ1* и *АОХ2* в разных условиях и возможной роли АОХ *C. reinhardtii* в качестве интегратора стрессовых сигналов.

**Цель работы** состояла в изучении регуляции синтеза и активности альтернативных оксидаз *Chlamydomonas reinhardtii* в стрессовых условиях.

В связи с этим были сформулированы следующие **задачи исследования**:

1. Охарактеризовать стрессовые условия, которые обуславливают увеличение транскрипции *АОХ*-генов и приводят к возрастанию АОХ-зависимого дыхания в клетках *C. reinhardtii*.
2. Выявить регулятор(ы) транскрипции, которые могут контролировать экспрессию *АОХ*-генов в стрессовых условиях.
3. Оценить, насколько различны условия, в которых клетки *C. reinhardtii* синтезируют две альтернативные оксидазы.
4. Экспериментально проверить существующую парадигму о том, что представители субсемейства АОХ2 конститутивно экспрессируются и не индуцируются в стрессовых условиях.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Альтернативная оксидаза как компонент электрон-транспортной цепи митохондрии

У высших растений, большинства грибов, водорослей и ряда простейших, кроме чувствительного к действию цианида дыхательного пути, который содержит цитохромы, есть нечувствительный к цианиду путь, названный альтернативным. Альтернативный путь состоит из одного компонента – локализованной во внутренней мембране митохондрий альтернативной оксидазы. Альтернативная оксидаза (АОХ) – терминальная оксидаза, которая ответвляется от основной дыхательной цепи на уровне убихинона и, используя электроны, получаемые от него, катализирует восстановление кислорода в воду. В отличие от комплексов I, III и IV дыхательной цепи, в которых перенос электронов сопровождается с транслокацией протонов через внутреннюю мембрану митохондрий с последующим использованием протонного градиента для синтеза АТФ, АОХ не является протонный каналом, и перенос электронов через АОХ не сопряжен с синтезом АТФ, а энергия окисления восстановленной формы убихинона – убихинола, выделяется в виде тепла (Рис.1).

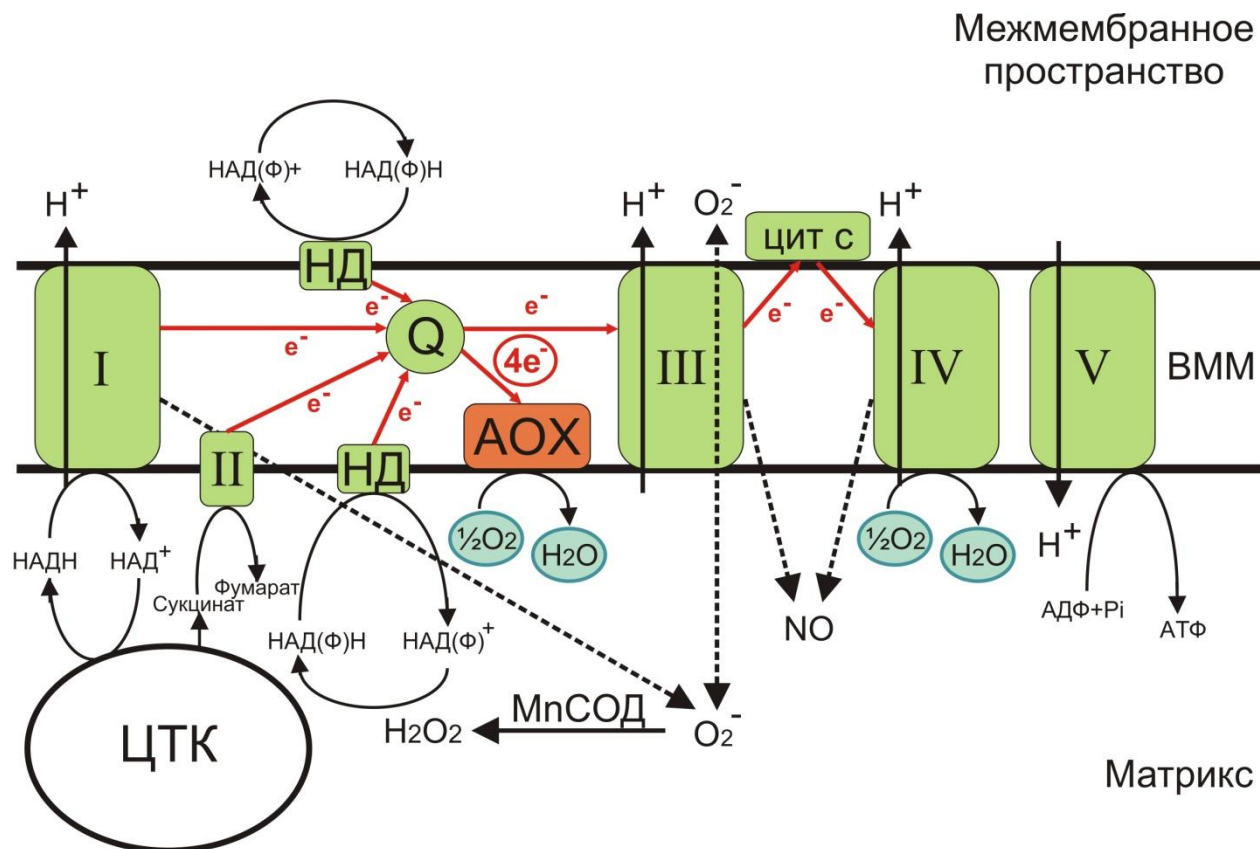
### 1.2. Характеристика альтернативных оксидаз высших растений

Альтернативные оксидазы (АОХ) найдены в митохондриях всех покрытосеменных, исследованных на сегодня, ряда голосеменных, а также мхов, печеночников, лycopодий, папоротников и лишайника *Physcomitrella patens* (Рогов и др., 2014; Neimanis et al., 2013).

#### 1.2.1. Структура и регуляция транскрипции АОХ-генов

Как и для большинства белков митохондрий, гены, кодирующие альтернативные оксидазы, локализованы в ядре. В геномах растений АОХ кодируются двумя разными подсемействами генов – *АОХ1* и *АОХ2*. Подсемейство *АОХ1* характерно для однодольных и двудольных растений, *АОХ2* - только для двудольных (Polidoros et. al., 2009; Considine et al., 2002). Предполагается, что варьирование количества генов обоих подсемейств у разных растений является результатом дупликации и последующих дивергенций. Так, в геноме цветкового растения *Arabidopsis thaliana* есть 4 гена семейства *АОХ1* (*АОХ1a*, *АОХ1b*, *АОХ1c*, *АОХ1d*) и только один ген семейства *АОХ2* (Clifton et al., 2006; Saisho et al., 1997; 2001b). У сои *Glycine max*, напротив, семейство *АОХ2* представлено двумя генами *АОХ2a* и *АОХ2b*, а *АОХ1* – одним (Costa et. al., 2004; McCabe et al., 1998). У риса *Oryza sativa*, как у представителя однодольных растений, гены *АОХ2* не обнаружены, но есть 4

гена семейства *AOX1* (Considine et al., 2002). Уникальным является геном моркови *Daucus carota L.*, поскольку содержит по два гена каждого семейства: *DcAOX1a*, *DcAOX1b*, *DcAOX2a* и *DcAOX2b* (Frederico et al., 2009; Campos et al., 2009; Costa et al., 2009a).

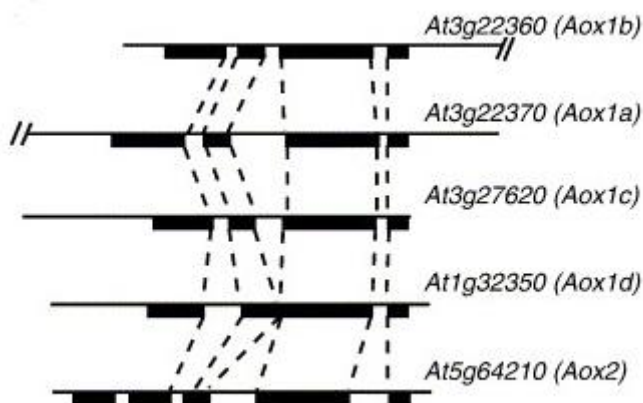


**Рис.1.** Схема организации электрон-транспортной цепи растений (по: Vanlerberghe, 2013).

I – НАДН-дегидрогеназный комплекс, II – Сукцинатдегидрогеназа, III - Цитохром- $bc_1$ -комплекс, IV - Цитохром с оксидаза, V – АТФ-синтетаза, Q – убихинон, Цит с – цитохром с, НД – альтернативные НАДФН-дегидрогеназы, ВММ – внешняя мембрана митохондрии.

Большая часть *AOX*-генов высших растений состоит из 4 экзонов, разделенных 3 геноспецифичными интронами, различающимися по длине, что предположительно может являться механизмом регуляции интенсивности экспрессии генов (Costa et. al., 2010; Considine et al., 2002). В процессе эволюции могла происходить потеря или приобретение интронов, поэтому у некоторых организмов встречаются гены с большим или меньшим количеством интронов и экзонов (Polidoros et al., 2009). Так, у *A. thaliana* *AOX1a*, *AOX1b*, *AOX1c* имеют стандартную генную структуру, *AOX1d* содержит 3 экзона и 2 интрона, *AOX2* – 5 экзонов и 4 интрона (Рис.2, Clifton et al, 2006).





**Рис. 2.** Масштабная диаграмма, иллюстрирующая структуру интрона / экзона АОХ-генов *Arabidopsis* (по: Clifton et al., 2006).

Гены семейства *AOX1* экспрессируются индуцибельно в ответ на действие биотических и абиотических факторов стресса, и тем самым обеспечивают сохранение функциональности митохондрий в неблагоприятных условиях. Экспрессия генов семейства *AOX2* носит конститутивный характер и зависит от ткани и стадии развития организма. Данная модель подтверждается паттернами экспрессии *AOX*-генов *A. thaliana* и *C. max*. В этих растениях экспрессия гена *AOX1* ограничена условиями экстремального стресса окружающей среды, тогда как *AOX2* не индуцируется стрессом, а экспрессируется в процессе нормального развития семени (Juszczuk et al., 2003; Finnegan et al., 1997; McCabe et al., 1998; Millar et al., 1997; Saisho et al., 1997; 2001a; 2001b; Simons et al., 1999; Tanudji et al., 1998; 1999). Однако, в результате недавних исследований установили, что у зернобобовых растений *Vigna unguiculata* (Costa et al., 2010), *Medicago sativa* и *M. truncatula* (Cavalcanti et al., 2013) экспрессия *AOX2b* увеличивается в ответ на окислительный стресс. Таким образом, экспрессия *AOX*-генов в ответ на стрессовое воздействие различной природы указывает на то, что АОХ относится к белкам стресса и играет роль в адаптации растения, но его конститутивное присутствие в некоторых тканях определяет его потенциальную роль в комплексном метаболизме растений (Juszczuk et al., 2003).

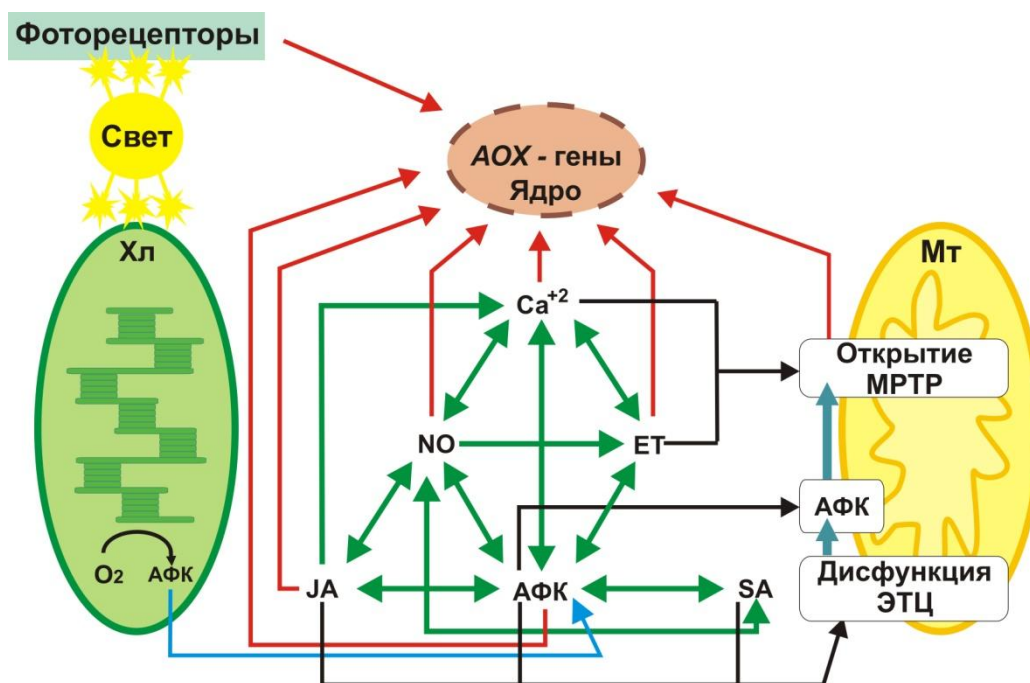
На сегодняшний день молекулярные механизмы регуляции экспрессии *AOX*-генов до конца не изучены. Накапливаются данные о вовлеченности ретроградных сигналов, индуцированных нарушением функционирования митохондрии, в регуляцию *AOX*-генов (Clifton et al., 2005; Vanlerberghe and McIntosh, 1996; Zarkovic et al., 2005). Кроме того, было показано, что АОХ индуцируется широким спектром условий, мишенью которых митохондрии не являются: свет (Escobar et al., 2004), доступности питательных веществ (Escobar et al., 2006) и ряд биотических и / или абиотических стрессов (Finnegan et al.,

2004).

Дисфункция компонентов ЭТЦ в результате действия биогенных и абиогенных факторов стресса на организм влияет на скорость генерации активных форм кислорода (АФК), которые являются ключевыми сигнальными молекулами регуляции ряда генов, а том числе *АОХ*-генов (Vanlerberghe, 1997; 2013). В результате единичных утечек электронов от I и III восстановленных компонентов ЭТЦ на молекулярный кислород  $O_2$  образуется супероксидный анион  $O_2^-$ . В матриксе митохондрий магний-зависимая супероксиддисмутаза (MnСОД) катализирует преобразование  $O_2^-$  в перекись водорода  $H_2O_2$  – наиболее агрессивную форму АФК (Рис. 1). Первоначальная гипотеза предполагала, что  $H_2O_2$  индуцирует экспрессию *АОХ*-генов путем прямого окисления транскрипционных факторов или модулирования процессов их фосфорилирования (Hanqing Feng et al., 2013; Neill et al., 2002a). Однако, тот факт, что митохондриальные АФК (мтАФК) более эффективны в индуцировании экспрессии *АОХ*-генов, чем цитоплазматические (цп) или хлоропластические (хл) АФК, аргументирует гипотезу. В настоящее время рассматривается альтернативная гипотеза, суть которой заключается в том, что АФК могут вызывать открытие митохондриальной мегапоры (митохондриальная пора перехода проницаемости, МРТР), что является критическим шагом в экспрессии *АОХ*-генов (Maxwell et al., 2002; Amirsadeghi et al., 2007). Обработка бонкрековой кислотой, ингибитором МРТР, полностью блокирует экспрессию генов *АОХ*, индуцированных АФК. Такой механизм может объяснить более быструю индукцию экспрессии *АОХ*-генов действием мтАФК, поскольку мтАФК более эффективны в открытии МРТР, чем цпАФК и хлАФК. Помимо этого, установлено, что промотор гена *АОХ1а* у *A. thaliana* содержит 10 цис-регуляторных элементов (CAREs), чувствительных к действию  $H_2O_2$  (Ho et al., 2008).

Помимо АФК известен ряд других сигнальных молекул, которые обладают способностью индуцировать *АОХ*-гены: салициловая кислота (SA), оксид азота (NO), жасмонат (JA), катион кальция ( $Ca^{2+}$ ) и этилен (ЕТ) (Xiong et al., 2002; Ederli et al., 2006; Rhoads et al., 1993; Huang et al., 2002.; Medentsev et al., 1999). SA, NO и JA увеличивают продукцию мтАФК за счет ингибирования цитохромоксидазы или нарушения митохондриального транспорта электронов (Norman et al., 2004; Brown et al., 2001; Zhang et al., 2008). ЕТ и  $Ca^{2+}$  помимо индукции образования АФК могут непосредственно увеличивать проницаемость митохондрии (Stael et al., 2012; Ku et al., 1970). Таким образом, вышеуказанные сигнальные молекулы индуцируют *АОХ*-гены либо за счет увеличения продукции АФК, либо за счет прямого воздействия на МРТР. Тот факт, что NO,  $Ca^{2+}$ , JA, ЕТ и SA регулируют экспрессию ядерных генов другими механизмами, в которые не вовлечены АФК или ми-

тохондрии (Neill et al., 2002; Kim et al., 2006; Song et al., 2011; Fujimoto et al., 2000; Johnson et al., 2003), дает основание предполагать, что эти сигнальные молекулы могут индуцировать *АОХ*-гены множественными сигнальными путями, которые могут быть АФК (или митохондрия) - зависимыми и независимыми (Рис. 3).



**Рис. 3.** Модель потенциальных сигнальных путей индукции *АОХ*-генов при абиотических стрессах (по: Hanqing Feng et al., 2013).

Установлено, что сигнальные молекулы могут влиять друг на друга (Рис. 3, Hanqing et al., 2013). Так, в результате действия экзогенной  $H_2O_2$  в клетках корня *Arabidopsis* повышает уровень цитоплазматического  $Ca^{+2}$ , который, в свою очередь, активирует продукцию  $H_2O_2$  (Rentel et al., 2004; Takeda et al., 2008). При обработке NO в суспензии клеток *Sophora flavescens* увеличивается концентрация JA, а внешнее применение JA активирует синтез NO (Xu et al., 2008). На этом основании можно предполагать, что потенциальное взаимодействие сигнальных молекул может обеспечить достаточную интенсивность физиологических и биохимических событий, необходимых для запуска МРТР или других путей регуляции экспрессии *АОХ*-генов.

Установлено, что экспрессия *АОХ*-генов индуцируется световыми сигналами в результате увеличения утечки электронов из фотосинтетической цепи переноса электронов, что отображается на уровнях внутриклеточных АФК (Dat et al., 2000). Помимо этого, установлено, что некоторые фоторецепторы, включая фитохромы, фототропины и криптохромы, играют важную роль в трансдукции светового сигнала для экспрессии *АОХ*-генов

(Zhang et al., 2010). Таким образом, разумно предположить, что эти два механизма могут координировать усиление интенсивности световых сигналов, ведущих к экспрессии *АОХ*-генов (Рис. 3).

АФК-независимый сигнальный путь активации транскрипции *АОХ*-генов предполагает наличие двухкомпонентной окислительно-восстановительной регуляторной системы, состоящей из киназы, воспринимающей редокс-состояние компонентов ЭТЦ, и ДНК-связывающего белка. Возможно, что высокие концентрации восстановленной формы убихинона (убихинола), образующиеся в результате дисфункции III и IV комплексов ЭТЦ, и/или изменение мембранного потенциала митохондрии в результате инактивации АТФ-синтетазы, воспринимаются двухкомпонентной окислительно-восстановительной системой, в результате чего активируется транскрипция *АОХ*-генов (Vanlerberghe, 1997). Помимо этого, установлено, что от функционального состояния митохондрий зависит экспрессия белков транспорта ауксина *гао3р*, *гао4р*, *гао5р* и *гао6р*, которые, связываясь с промоторной областью *АОХ*-генов, регулируют их экспрессию (Рогов и др, 2014).

Метаболизм углерода может эффективно регулировать экспрессию *АОХ*-генов. Увеличение концентрации одного из интермедиатов ЦТК – цитрата, вызванное ингибированием аконитазы монофлюороацетатом или добавление экзогенной  $H_2O_2$ , активирует экспрессию *АОХI*-гена (Vanlerberghe, 1997; 2013). В условиях гипоксии образование NO ингибирует аконитазу, что приводит к накоплению цитрата и, соответственно, экспрессии *АОХ*-генов (Vanlerberghe, 2013; Gupta et al., 2012).

Обобщая вышеизложенное, можно заключить следующее: регуляция *АОХ*-генов осуществляется множественными сигнальными путями, в которые вовлечены сигнальные молекулы митохондриальной и хлоропластной ретроградной регуляции, основными из которых являются АФК, которые могут активировать транскрипцию *АОХ*-генов непосредственно или путем открытия митохондриальной мегапоры (МРТР). Возможно, экспрессия *АОХ*-генов может регулироваться двухкомпонентной окислительно-восстановительной системой в зависимости от редокс-состояния компонентов ЭТЦ. Помимо этого, уровни интермедиатов ЦТК, отображающие продукцию ЦТК, как маркера функциональной активности митохондрий, регулируют экспрессию *АОХ*-генов. Для большего понимания молекулярных механизмов активации транскрипции *АОХ*-генов требуются дальнейшие исследования.

### 1.2.2. Структура и механизмы регуляции активности *АОХ* белков

Альтернативные оксидазы митохондрий многих высших растений, некоторых гри-

бов, а так же одноклеточной зеленой водоросли *C. reinhardtii* были идентифицированы с помощью моноклональных антител, полученных к высокоочищенному препарату АОХ-белка лилии *S. guttatum* (Dinant et al., 2001; Derzaph et al., 1996; Elthon et al., 1986; 1987; 1989).

АОХ-белки синтезируются в цитоплазме в виде предшественников, имеющих на N-конце лидерную последовательность, состоящую в среднем из 50 аминокислотных остатков. N-концевой домен лидерной последовательности обогащен положительно заряженными аминокислотными остатками и формирует амфифильную  $\alpha$ -спираль, необходимую для специфического узнавания белками «импортной машины» митохондрии (транслоказы внешней (ТОМ) и внутренней (ТИМ) мембран митохондрии). С-концевой домен содержит специфические сайты, по которым в матриксе митохондрий происходит отщепление сигнальной последовательности, в результате чего белок-предшественник превращается в зрелую форму. После процесса трансляции белки-предшественники взаимодействуют с цитоплазматическими шаперонами и рядом цитозольных факторов, которые препятствуют сворачиванию и обеспечивают доставку к рецепторным компонентам ТОМ. Главной движущей силой для импорта большинства белков внутренней митохондриальной мембраны является мембранный потенциал, генерируемый за счет энергии окисления субстратов компонентами дыхательной цепи (Рогов и др., 2014; Зайцева и др., 2000).

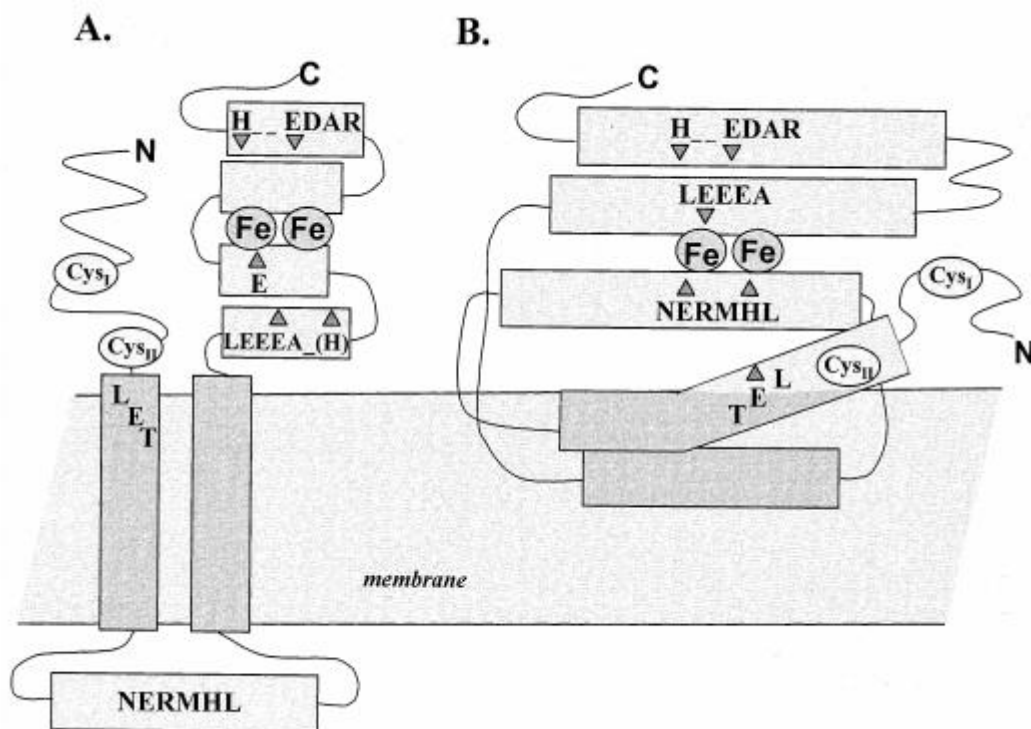
Альтернативные оксидазы относятся к семейству карбоксилатных белков, взаимодействующих с ионами железа. Аминокислотная последовательность АОХ у всех ныне изученных организмов содержит четыре высококонсервативных региона: LET (Лей, Глу, Тре), NERMHL (Асп, Глу, Арг, Мет, Гис, Лей), LEEEA (Лей, Глу, Глу, Глу, Ала) и RADE\_H (Арг, Ала, Асп, Глу, \_, Гис) (Berthold et al., 2000).

Существует две возможные модели структурной организации альтернативных оксидаз: SUM (Siedow-Umbach-Moore) – рассматривает АОХ как интегральный белок внутренней мембраны митохондрии, и AN (Andersson-Nordlund) – предлагает полуинтегральную локализацию белка (Рис. 4). В структуре SUM-модели фермента выделяют четыре консервативных домена: две трансмембранные  $\alpha$ -спирали M1 и M2, экспонированная на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрии  $\alpha$ -спираль S и N- и С- терминальные гидрофильные участки, локализованные в матриксе митохондрии (Vanlerberghe et al., 1997; McIntosh, 1994; Siedow et al, 1995). Такая ориентация создает возможность для взаимодействия оксидазы с убихинолом в межмембранном пространстве и кислородом в матриксе. У высших растений аминокислотные остатки гистидина (H) и глутаминовой

кислоты (E), входящие в состав E-X-X-H-мотивов LEEEA (E<sub>301</sub>-X-X-H<sub>30</sub>) и RADE\_H (E<sub>356</sub>-X-X-H<sub>359</sub>) регионов, участвуют в координации двух атомов железа, тем самым формируя активный центр фермента (Siedow et al., 1995; Dinant et al., 2001; Deborah et al., 2000). Только один из атомов железа вовлечен в процесс связывания кислорода во время каталитического цикла. (Siedow et al., 1995). Однако, в ходе исследований первичной структуры АОХ-белков было установлено, что Гис в мотиве E<sub>301</sub>-X-X-H<sub>304</sub> неконсервативен, а у ряда дрожжей, грибов и низших растений (*C. reinhardtii*) – отсутствует, что аргументирует гипотезу образования активного центра E-X-X-H-мотивами LEEEA и RADE\_H регионов (Deborah et al., 2000; Dinant et al., 2001). Помимо этого, короткие  $\alpha$ -спирали модели SUM не могут обеспечить высокого уровня стабилизации молекулы белка, что не дает возможность рассматривать SUM-модель в качестве правильной (Deborah et al., 2000). Согласно модифицированной AN-модели структуры АОХ, остатки гистидина и глутаминовой кислоты в E-X-X-H-мотива в NERMHL регионе участвует в формировании четырехспирального активного центра (Deborah et al., 2000; Andersson et al., 1999). Таким образом, AN-модели отрицает возможность наличие полноценных трансмембранных доменов. Шесть высококонсервативных аминокислотных остатков Глу209, Глу248, Гис251, Глу300, Глу356 и Гис359, расположенных в пределах четырех консервативных регионов, обнаружены в первичной структуре всех изученных АОХ-белков. Согласно AN-модели, они участвуют в формировании активного центра фермента. Остатки Ала212, Про215, Ала/Сер245, Гис292, Гли296 и Гис299, расположенные в пределах I, II и III спирали формируют расщелину, которая может служить сайтом взаимодействия фермента с убихинолом (Dinant et al., 20001).

На основании структурных и регуляторных различий выделяют два функциональных типа АОХ-белков: гомодимер высших растений и мономер грибов (Gérin et al., 2010, Dinant et al., 2001). Необходимо отметить, что не всегда наблюдается корреляция между обилием АОХ белка и его активностью, то есть увеличением доли альтернативного дыхания (McDonald et al., 2002). Это дало основание исследовать посттрансляционные механизмы активации фермента. Восстановленная форма убихинона – убихинол – является общим донором электронов для цитохромной и альтернативной оксидаз. В отличие от основной оксидазы, АОХ не активируется до тех пор, пока уровень убихинола не достигает высокого порогового значения. Механизмы, приводящие к накоплению высоких концентраций убихинола: дисфункция III и IV комплексов ЭТЦ блокирует окисление убихинола и передачу электронов далее по цитохромному пути, инактивация АТР-синтетазы ведет к остановке окислительного фосфорилирования АДФ и изменению мембранного

потенциала митохондрии (Рис. 4).



**Рис.4.** Схематическое изображение двух моделей мономера АОХ-белка. А – SUM-модель. В – модифицированная модель AN (по: Deborah et al., 2000).

Трансмембранные и спиральные участки С-концевых доменов (прямоугольники) нарисованы в масштабе, чтобы обеспечить визуальное сравнение длин доменов SUM и AN моделей. N- и С-концевые и соединительные участки спиралей изображены не в масштабе. Остатки гистидина (H) и глутаминовой кислоты (E), связывающие ионы железа, изображены треугольниками. Консервативные остатки цистеина (CysI, CysII) в N-терминальном домене белка, участвующие в димеризации мономеров у высших растений, изображены кругами.

У высших растений высококонсервативные остатки цистеина (Cys128 и Cys203) на N-концевых участках задействованы в механизмах посттрансляционной регуляции активности фермента (Рис. 4). В частности, у *S. guttatum* и *A. thaliana* регуляторный остаток Cys128 отвечает за формирование лабильных дисульфидных мостиков между мономерами АОХ. Нековалентный тип связи между мономерами обеспечивает активную восстановленную форму фермента, в то время как образование ковалентных дисульфидных связей между регуляторными цистеиновыми остатками вследствие их окисления приводит к инактивации фермента (Umbach et al., 1996). Окисление субстратов ЦТК, в частности НАДФН, приводит к восстановлению дисульфидных связей, и, следовательно, к активации фермента (Vanlerberghe, 2013).

Третий механизм посттрансляционного регулирования заключается в активации фермента  $\alpha$ -кетокислотами по остаткам обоих Cys128 и Cys203. Накопление внутримитохондриальной пировиноградной кислоты приводит АОХ в функционально активное состояние вне зависимости от уровня восстановленности убихинона (Рис. 4, Dinant et al., 2001; Vanlerberghe, 1997). В изоферментах, в которых остаток Cys128 заменен серином, стимуляция активности происходит под действием сукцината, а не пирувата (Vanlerberghe, 2013). АОХ грибов и дрожжей существует в виде мономера, и остатки Cys128, Cys203 и регуляторный участок из 40 аминокислотных остатков, окружающий их, отсутствуют (Dinant et. al., 2001). Таким образом, регуляция активности АОХ  $\alpha$ -кетокислотами невозможна. Активация фермента происходит посредством присоединения пуриновых моно- и дифосфатов AMP, ADP, dAMP и GMP (Рогов и др. 2014; Umbach et. al., 2000).

Характерной особенностью альтернативного пути является его эффективное ингибирование ароматическими гидроксамовыми кислотами, в частности салицилгидроксамом. Описаны и некоторые другие ингибиторы АОХ: 2,5-дибромо- 3-метил-6-изопропил-п-бензохинон, дисульфирам, 5-децил-6-гидрокси-4,7-диоксобензотиазол, пропилгаллат, аскофуранон (Рогов и др, 2014).



**Рис.5.** Основные механизмы активации альтернативных оксидаз (по: Vanlerberghe, 1997).



Обобщая имеющиеся в литературе данные, можно заключить, что метаболические условия, приводящие к накоплению пирувата, внутримитохондриального НАДФН и высоких концентраций убихинола, регулируют активность фермента и имеют потенциал для увеличения транспорта электронов на АОХ.

### **1.2.3. Функции АОХ**

Ряд исследований, проведенных на высших растениях, показал роль АОХ как в контроле метаболического гомеостаза, так и в адаптации к стрессовым воздействиям различной природы. Предположительно, АОХ вовлечена в процессы передачи сигналов в стрессовых условиях, через контроль АФК и NO как потенциальных сигнальных молекул.

#### **1.2.3.1. Роль АОХ в контроле метаболического гомеостаза**

АОХ обеспечивает лабильность дыхательной системы за счет сопряжения путей метаболизма углерода, активности ЭТЦ и оборота АТФ. Механизмы регуляции распределения и скорости потока электронов между АОХ и цитохромоксидазой могут обеспечить важный механизм для переключения катаболического и анаболического режима дыхания, а также обеспечить средства для контроля углеродного, энергетического и редокс состояний клетки (Vanlerberghe, 2013).

В растительных клетках существует тесная взаимосвязь между двумя энергопреобразующими органеллами – хлоропластами и митохондриями. У растений метаболизм углерода зависит от скорости ассимиляции атмосферного CO<sub>2</sub> в процессе фотосинтеза. Высокие концентрации CO<sub>2</sub> стимулируют фотосинтетическую активность растений. Однако, накопление углерода сводит активность фотосинтеза к минимуму, что никогда не является выгодным для растения. Предполагают, что активация АОХ и увеличение доли альтернативного дыхания могут обеспечить утилизацию больших количеств углерода, усвоенных в условиях высоких концентраций CO<sub>2</sub>. То, как реагирует дыхательная система, может иметь решающее значение для определения того, как фотосинтез будет реагировать на будущие условия более высокого уровня атмосферного CO<sub>2</sub>. (Vanlerberghe, 2013). Помимо этого, в процессе фотосинтеза образуется избыток восстановительных эквивалентов и, если не происходит рассеивания энергии, этот избыток может вызвать окислительный стресс и повреждение фотосинтетического аппарата. Индукция АОХ, наряду с экспортом малата из хлоропластов в митохондрии с помощью малат-оксалоацетатного шунта и экспортом гликолата в пероксисомы, где он превращается в глицин, а затем транспортируется в митохондрии, где окисляется до серина, предотвра-

щают перевосстановление компонентов ЭТЦ хлоропласта. При ингибировании АОХ *A. thaliana* на свету в хлоропластах происходило быстрое накопление НАФН и, как следствие, сверхвосстановление акцепторной части фотосистемы I (Ho et al., 2008). Таким образом, АОХ в растениях, окисляя восстановительные эквиваленты, предотвращает АФК-индуцированную деструкцию фотосинтетического аппарата и, возможно, активируя утилизацию больших количеств углерода, обеспечивает поддержание активности фотосинтеза.

Ключевая роль АОХ в контроле энергетического статуса клеток была впервые установлена в термогенезе растений семейства *Araceae*: *S. guttatum* и *Arum maculatum* (Рогов и др., 2014; Ito et al., 2011). В митохондриях термогенных тканей и органов многократное возрастание активности фермента и кардинальная перестройка структуры дыхательной цепи, в результате чего АОХ становится единственной терминальной оксидазой, а окисление субстратов сопровождается выделением энергии в виде тепла, а не молекул АТФ, способствует испарению летучих веществ - аттрактантов для насекомых, опыляющих растение (Molen et al., 2006).

### 1.2.3.2. Роль АОХ при адаптации к стрессовым воздействиям

Индукция АОХ увеличивает метаболическую пластичность клеток, которая может быть полезной для быстрой адаптации к меняющимся источникам питания, в условиях действия биотических и абиотических факторов, ограничивающих активность основного цитохромного пути окисления. В последнее время АОХ рассматривается как маркер условий стресса и кандидат для клеточного репрограммирования в этих условиях (Рогов и др., 2014).

Наиболее изученным абиотическим фактором, который индуцирует экспрессию АОХ у высших растений, является низкая температура. Изменение температурных режимов отображается на распределении электронов между компонентами основного пути дыхания и АОХ. Ряд исследований показал увеличение АОХ-транскрипта и / или АОХ-белка у разных видов растений в условиях роста при низких температурах (Wang et al., 2011; Ito et al., 1997; González-Meler et al., 1999). При кратковременном действии низкой температуры (5<sup>0</sup>С) у *A. thaliana* наблюдается увеличение активности АОХ, которое не обусловлено увеличением количества АОХ-белка (Armstrong et al., 2008). Другое исследование показало, что количество АОХ в клетках *A. thaliana*, выращенных при 12<sup>0</sup>С, больше, чем в растении, выращенном в условиях оптимального температурного режима, что дает основание предполагать важную роль альтернативного пути дыхания при длительном

действии низкой температуры (Fiorani et al., 2005). Накопление растворенных углеводов является общей реакцией растений на низкую температуру. В условиях холодового стресса в клетках мутантных *A. thaliana*, лишенных АОХ, накапливается больше крахмала, чем у дикого типа (Watanabe et al., 2008), в то время как для табака наблюдается кардинально противоположная картина (Wang et al., 2011). Противоречивые данные дают основание предполагать, что изменения активности АОХ в условиях холодового стресса, вероятно, не обусловлены изменениями доступности углеводов для дыхания. Предполагают, что функционирование АОХ в условиях низкотемпературного стресса будет способствовать поддержанию фотосинтетической активности хлоропластов и адаптации растений к низким температурам.

Ряд исследований показал роль АОХ в адаптации организмов к условиям высоких температур. Ростки риса с конститутивной избыточной экспрессией АОХ более устойчивы к росту в условиях высокой температуры, чем дикий тип (Murakami et al., 2008). При сравнении чувствительных и резистентных к нагреванию видов *Agrostis* установили, что рост чувствительных видов в условиях высокой температуры обусловлен увеличением доли альтернативного дыхания (Rachmilevitch et al., 2007).

Металлы оказывают влияние на функционирование матричных и мембранных белков, в частности компонентов ЭТЦ. Токсическое действие Al характеризуется дисфункцией основной дыхательной цепи в протопластах листьев *A. thaliana*, что сопровождается накоплением АФК. Экспрессия гена *AtAox1a* в *A. thaliana* предотвращает индуцированную алюминием клеточную смерть посредством уменьшения уровня АФК на начальной стадии (Li et al., 2011). Установлено, что избыток Cu ингибирует цитохромное дыхание и индуцирует экспрессию АОХ-генов (Pádua et al., 1999). Установлено увеличение доли альтернативного дыхания у одноклеточной зеленой водоросли *Euglena gracilis* в результате стрессового воздействия катионов кадмия ( $\text{Cd}^{+2}$ ) на клетки (Castro-Guerrero et al., 2008).

Солевой стресс оказывает негативное воздействие на функционирование митохондрии: снижается активность переноса электронов, увеличиваются уровни АФК (Zsigmond et al., 2012; Vanlerberghe, 2013). У ряда растений установлена индукция экспрессии АОХ-генов и увеличение доли альтернативного дыхания в ответ на солевой стресс. При длительном действии солевого стресса (14 дней) в клетках листьев гороха наблюдалось уменьшение доли основного дыхания, в то время как доля цианидрезистентного дыхания достигает 50 % от общего (Marti et al., 2011). В условиях солевого стресса у *A. thaliana* происходит увеличение уровня внутриклеточного  $\text{Na}^+$  и продукции АФК. При этом на-

блюдается резкое увеличение экспрессии гена *AtAox1a*. Высокая активность АОХ в корнях растения помогает *A. thaliana* расти в среде, насыщенной NaCl и поддерживать низкий уровень внутри клеточного  $\text{Na}^+$  (Smith et al., 2009).

Ряд исследований показал изменение количества АОХ (транскрипта и белка) в ответ на низкое содержание  $\text{O}_2$  в среде (гипоксия) и его отсутствие (аноксия). Однако, на сегодняшний день нет четкой картины. Так, например, было показано, что АОХ либо увеличивается, либо уменьшается в ответ на гипоксию. Поэтому значение АОХ в акклиматизации организмов в условиях недостатка  $\text{O}_2$  остается неясным (Vanlerberghe, 2013). Сродство к  $\text{O}_2$  у АОХ ниже, чем у цитохромоксидазы, что делает менее вероятным, что АОХ будет иметь заметную активность в условиях низких концентраций  $\text{O}_2$ . Однако, возможно, именно такой недостаток активности может служить сигналом состояния гипоксии (Millar et al., 1994). Очевидно, что данный вопрос остается открытым и требует дальнейших исследований для поиска ответов.

Было показано, что дефицит фосфата (P) увеличивает активность АОХ у ряда растений (Vanlerberghe, 2013). Общим метаболическим последствием недостатка P является значительное снижение концентрации аденилатов и  $\text{P}_i$ . Поскольку АДФ и  $\text{P}_i$  являются субстратами для субстратного фосфорилирования, предположили, что индукция АОХ может представлять собой средство для поддержания метаболизма углерода и потока электронов в условиях дефицита P (Theodorou et al., 1993). При выращивании в условиях недостатка P суспензии трансгенных клеток табака, лишенных АОХ, наблюдалось ограниченная скорость дыхания, изменение метаболизма P и N, накопление углеводов и увеличение концентрации внутриклеточных АФК (Parsons et al., 1999). Таким образом, ограниченная доступность АДФ и  $\text{P}_i$  обуславливают необходимость АОХ для предотвращения перевосстановления компонентов ЭТЦ и продукции АФК.

Инфицирование патогенами приводит к накоплению ряда сигнальных молекул ( $\text{SA}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) индукции и координации защитных реакций растений, в том числе реакции сверхчувствительности у высших растений, приводящей к локальному отмиранию инфицированных клеток тканей и органов. Инфицирование патогенами приводит также к активации пентозофосфатного пути и НАДФ – зависимого малик-фермента, что, в свою очередь, приводит к увеличению пула НАДФН и пирувата, являющегося активатором АОХ растений (Рогов и др., 2014).

При ингибировании терминальных компонентов основной дыхательной цепи митохондрий или утрате способности синтезировать эти компоненты, функционирование альтернативного пути в этих условиях обеспечивает возможность реокисления НАДФ и,

следовательно, возможность выживания.

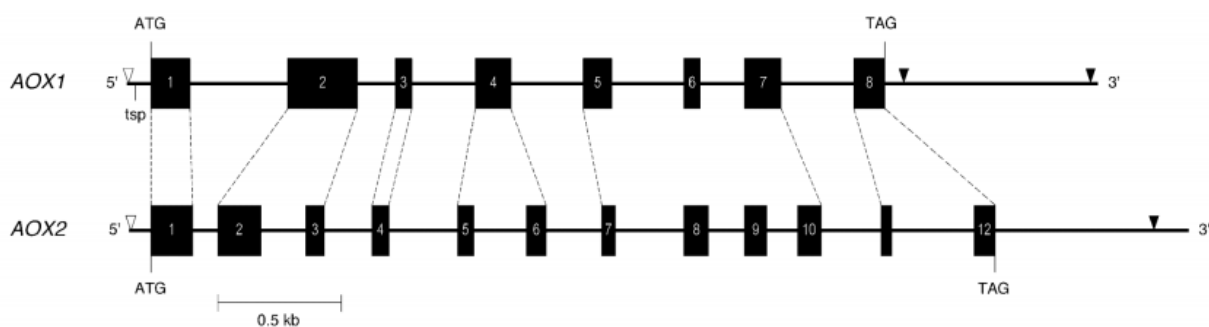
Таким образом, альтернативные оксидазы высших растений обеспечивают адаптацию организмов к различным условиям стрессов в основном за счет подавления продукции АФК, стимулирующих апоптоз, и реокисления восстановленных компонентов.

### 1.3. Характеристика альтернативных оксидаз *Chlamydomonas reinhardtii*

#### 1.3.1. Структура и регуляция транскрипции *AOX*-генов

В геноме одноклеточной зеленой водоросли *C. reinhardtii* выявлено два гена, высоко идентичных *AOX* гену *Aspergillus niger*: *AOX1* в IX хромосоме и *AOX2* в III хромосоме, кодирующих альтернативные оксидазы, принадлежащие к двум соответствующим семействам АOX1 и АOX2 (Kirimura et al., 1999; Dinant et al., 2001; Baurain et al., 2003).

Кодирующие области *AOX1* содержат 8 экзонов и 7 интронов, *AOX2* - 12 экзонов, 11 интронов. Отмечено, что 5 интронов занимают одинаковые положения в обоих генах. Размеры интронов находятся в диапазоне 103-398 пар нуклеотидов. Как и многие гены водоросли, *AOX*-гены содержат длинный 3'-нетранслируемый участок (868 пар оснований). Предположительные сайты полиадеплирования - TGТАА мотивы – располагаются в позиции 1255 и на расстоянии 18 пар нуклеотидов от 3'-конца. Соотношение G+C составляет 62,4%. Методом удлинения праймеров удалось установить, что 5'-конец мРНК *AOX1* располагается на 62 основания выше стартового кодона (Рис.6, Dinant et al., 2001).



**Рис.6.** Схематическое изображение структуры *AOX1* и *AOX2* генов *C. reinhardtii* кодона (по: Dinant et al., 2001).

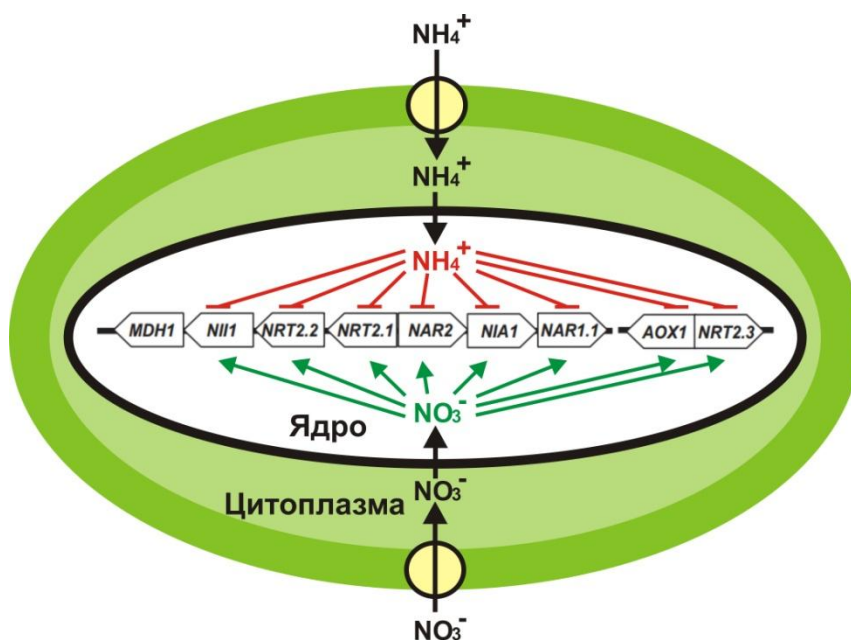
Черными блоками обозначены экзоны, горизонтальными линиями – интроны, пунктирными вертикальными линиями - гомологичные экзоны. Старт- (ATG) и стоп-(TAG) кодоны рамки считывания изображены на соответствующих позициях. Предполагаемые ТАТА-боксы и сайты полиадеплирования отмечены белыми и черными треугольниками, соответственно. Точка начала транскрипции (tsp) *AOX1* находится на 62 пары оснований выше от стартового.

Результаты нозерн-блот анализа тотальной РНК *C. reinhardtii* с зондами, специфичными к *AOX1* и *AOX2*, показали, что транскрипт 2,3 кб соответствует зрелой молекуле мРНК *AOX1* гена, а слабый сигнал 1,9 кб – мРНК *AOX2*, который появляется после значительно более длительного времени экспозиции (5 дней) при гибридизации той же мембраны с зондами к *AOX2* (Dinant et al., 2001). Анализ последовательности из 2010 пар оснований кДНК *AOX1* *C. reinhardtii* выявил открытую рамку считывания (ORF), состоящую из 1080 нуклеотидов с потенциальным стартовым кодоном ATG в позиции +63. ORF кодирует белок из 360 аминокислотных остатков с молекулярной массой 38,4 кДа. На N-конце белка-предшественника находится 8 остатков Лей, 7 остатков Ала, 4 остатка Сер и LASTGRLLGS мотив, что способствует формированию амфифильной  $\alpha$ -спирали. После процессинга зрелому *AOX1* соответствует последовательность из 310 аминокислотных остатков, а прогнозируемая молекулярная масса фермента составляет 33,4 кДа (Dinant et al., 2001). Анализ последовательности фрагмент из 1700 пар нуклеотидов, соответствующего кДНК *AOX2*, выявил ORF из 1041 нуклеотидов с потенциальным стартовым кодоном ATG в положении +50. Молекулярная масса незрелого белка *AOX2* равна 37,6 кДа и состоит из 347 аминокислотных остатков. Лидерная последовательность состоит из 50 аминокислотных остатков и содержит 11 остатков Ала, 9 остатков Лей и LASTGRLLGS-мотив. Непосредственно выше этого сегмента расположена повторяющаяся последовательность LPALVPFAA. Сайты, по которым происходит процессинг, не установлены. Зрелому белку соответствует молекулярная масса 32,2 кДа. (Dinant et. al., 2001).

У *C. reinhardtii* ген *AOX1* находится в одном из двух кластеров генов, участвующих в пути ассимиляции нитратов. Транскрипция всех генов обоих кластеров, кроме *MDH1* гена, кодирующего малатдегидрогеназу хлоропласта, регулируется источником азота в среде: индуцируется присутствием нитрата, ингибируется аммонием (Рис.7, Gerin et. al, 2010; Molen et. al., 2006; Quesada et. al., 1993). Ген *NRT2.3*, продуктом которого является высокоафинный нитрит/нитратный транспортер (HANNiT), расположен в противоположном направлении относительно гена *AOX1*. Промотор *AOX1* гена, размером 1,4 кб, локализован в регионе -1364 +60 относительно сайта начала транскрипции и содержит стартовый кодон ATG гена *NRT2.3* (-1342) (Baurain et. al., 2003). У водоросли регуляторные последовательности в большинстве случаев локализованы на расстоянии 200 - 300 пар нуклеотидов от сайтов начала транскрипции (Kindle, 1998). Это правило подтверждает тот факт, что укороченного промотора, состоящего из 106 пар нуклеотидов (-253 +59), достаточно, чтобы обеспечить базальный уровень транскрипции и регуляции *AOX1* гена (Baurain: et. al., 2003; Molen et. al., 2006). Элементы, лежащие в диапазоне -133 -39, необходимы для

экспрессии *AOX1* гена, а элементы, обеспечивающие нитрат-зависимую индукцию транскрипции должны находиться в регионе -39 +59. Элементы дистальной части промотора, включающие *NRT2.3*, необходимы для обеспечения полноценных экспрессии и регуляции *AOX1* (Baurain: et. al., 2003).

У *C.reinhardtii* была выявлена роль АОХ1 в адаптации клеток к росту на нитрате в качестве источника азота. Известно, что фотосинтетические эукариоты предпочитают использовать аммоний в качестве основного источника азота, так как для его ассимиляции требуется меньшее количество энергии, чем при усвоении нитрата. В матриксе митохондрий клеток, выращенных на нитрате, наблюдается индукция катаболических путей (ЦТК, катаболизм L-аргинина и пуринов), результатом чего являются высокие концентрации восстановленных НАДФН и убихинона, что отображается на скорости генерации АФК.



**Рис.7.** Схематическое изображение локализации *AOX1*-гена в структуре одного из кластеров генов, ответственных за пути ассимиляции нитрата у *C. reinhardtii* (по: Gerin et. al, 2010).

Два механизма, направленные на предотвращение образования АФК - активация АОХ и экспорт восстановленных эквивалентов из митохондрий в цитоплазму и хлоропласты - обеспечивают процесс восстановления нитрата и нитрита до аммония. Помимо этого, предположительная роль АОХ при росте на нитрате заключается в увеличении активности ЦТК, путем индукции формирования CO<sub>2</sub>, который затем под действием карбоангидразы конвертируется в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Далее HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> преобразуется в оксалоацетат и малат пироваткарбоксилазой и фосфоэнолпируваткарбоксилазой (Gerin et al., 2010). Таки образом,

индукция АОХ в клетках, выращенных на среде, содержащей нитраты, может иметь двоякую роль: (1) снижает уровни восстановленного пула убихинонов и, таким образом, подавляет производство АФК, (2) увеличивает активность ЦТК, позволяет увеличить количество экспортируемых в цитоплазму и хлоропласты восстановленных эквивалентов, необходимых для восстановления нитратов и нитритов. Таким образом, пластичность митохондрий позволяет клетке противостоять энергетической стоимости при ассимиляции нитратов, и роль АОХ в этой пластичности объясняет локализацию *AOX1* в кластере генов ассимиляции нитратов (Gerin et al., 2010).

У *C.reinhardtii* изменении источника азота с аммония на нитрат индуцирует транскрипцию *AOX1* гена, что также отражается на уровне белка (Baurain: et. al., 2003; Molen et. al., 2006). При этом, уровни альтернативного дыхания почти в два раза выше (15 нмоль  $O_2/\text{мин}^{-1} \cdot 10^7$  клеток) при культивировании в среде, содержащий нитрат, чем на среде с аммонием (6,5 нмоль  $O_2/\text{мин}^{-1} \cdot 10^7$  клеток) (Baurain: et. al., 2003). Мутации в *NIA1* гене, кодирующим нитратредуктазу, или инактивация фермента азидом натрия, следствием чего является неспособность организма ассимилировать нитрат, дополнительно усиливают экспрессию *AOX1* гена при культивировании на среде с нитратом. Из этого следует, что внутриклеточное накопление нитратов обеспечивает постоянный позитивный контроль экспрессии гена. Модель регуляции АОХ в ответ на источник азота у водоросли специфична, так как является противоположной к той, что наблюдается у высших растений. Так, у *A. thaliana* транскрипция трех генов *AOX1a*, *AOX1d*, *AOX2* индуцируется аммонием, а *AOX1b*, *AOX1c* - ингибируется нитратом (Gérin et al., 2010).

На сегодняшний день также изучено действие низких и высоких температур на экспрессию *AOX1* гена у *C. reinhardtii*. Исследование регуляции АОХ1 у *C. reinhardtii* в ответ на тепловой стресс показали, что транскрипция *AOX1* гена индуцируется высокими температурами (40°C), что сказывается на увеличении уровней мРНК, белка и доли альтернативного дыхания в первые 15 мин ТШ. Поскольку, в отличие от белков теплового шока, промотор *AOX1* не содержит элементов теплового шока (HSE), соответственно, основной фактор теплового шока HSF1 не контролирует транскрипцию *AOX1* в условиях высоких температур. Есть основания предполагать, что протеиновые киназы вовлечены в путь активации транскрипции *AOX1* в условиях теплового шока, так как ингибирующее действие стауроспорина на киназы приводит также к снижению уровней транскрипции *AOX1*. Помимо этого, высокие температуры индуцируют поступление в клетку водоросли экзогенного  $Ca^{+2}$ , который дополнительно увеличивает экспрессию *AOX1* (Zalutskaya et. al., 2015). Сдвиг температуры с 28 на 16°C приводит к активации транскрипции гена



*AOX1*, накоплению белка во внутренней мембране митохондрии и увеличению доли альтернативного пути дыхания в течение 48 часов (Molen et. al., 2006).

При сравнительном анализе последовательностей АОХ-белков *C. reinhardtii* и альтернативных оксидаз высших растений, дрожжей и грибов, высокая идентичность последовательностей была обнаружена в центральном и С-концевом доменах. Однако внимание привлек тот факт, что сродство с АОХ-белками грибов и дрожжей в среднем на 5-7% выше, чем с белками высших растений (Berthold et al., 2000). Аналогично оксидазам грибов и дрожжей, АОХ водоросли не содержит остатки Cys128, Cys203 и регуляторный участок из 40 аминокислотных остатков. Вторым фактором, обеспечивающим высокую идентичность первичных структур АОХ-белков грибов и *C. reinhardtii*, является наличие вставки из 18-25 аминокислотных остатков, отсутствующих у высших растений: у грибов в положении 171-195, у водоросли - 171-179. (Dinant et. al., 2001). Из полученных данных следует, что АОХ водоросли функционирует в виде мономерного белка. При сравнительном анализе аминокислотных последовательностей АОХ1 и АОХ2 *C. reinhardtii* для отдельных сегментов был обнаружен высокий уровень сходства, но только 57,6 % идентичности наблюдалось для всей последовательности. Несмотря на невысокое сходство последовательностей в N-концевых доменах, 9 из 11 аминокислотных остатков идентичны и вовлечены в образование амфифильной  $\alpha$ -спирали сигнальной последовательности незрелого белка (Dinant et. al., 2001).

Обобщая имеющийся в настоящее время литературный материал, следует отметить, что несмотря на имеющиеся литературные данные относительно регуляции и функционирования альтернативных оксидаз, многие вопросы пока остаются без ответа. Так, например, практически не изучена роль белков подсемейства АОХ2 и недостаточно информации о роли представителей АОХ1 у одноклеточных организмов. Одноклеточная зеленая водоросль *C. reinhardtii*, у которой выявлены белки обоих подсемейств, АОХ1 и АОХ2, представляют собой удобную модельную систему для изучения их регуляции в условиях стрессов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты исследования

Объектом исследования служил штамм одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* cw15-325 (cw15mt<sup>+</sup>arg7-8nit1<sup>+</sup>nit2<sup>+</sup>), любезно предоставленный профессором М. Шродой (Технический университет г. Кайзерслаутерн, Германия).

### 2.2. Условия культивирования

Культуры *C. reinhardtii* cw15-325 выращивались в трис-ацетат-фосфатной среде TAP (Gorman and Levine, 1965) следующего состава: 25 мл/л раствор А, 1 мл/л фосфатного буфера, 1 мл/л раствора микроэлементов, 1 мл/л ледяной уксусной кислоты (CH<sub>3</sub>COOH), 2,42 г/л трис (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>), 1 г/л ацетата натрия (CH<sub>3</sub>COONa). В среду дополнительно вносили раствор аргинина (100 мг/л). В таблице 1 представлен состав компонентов среды TAP.

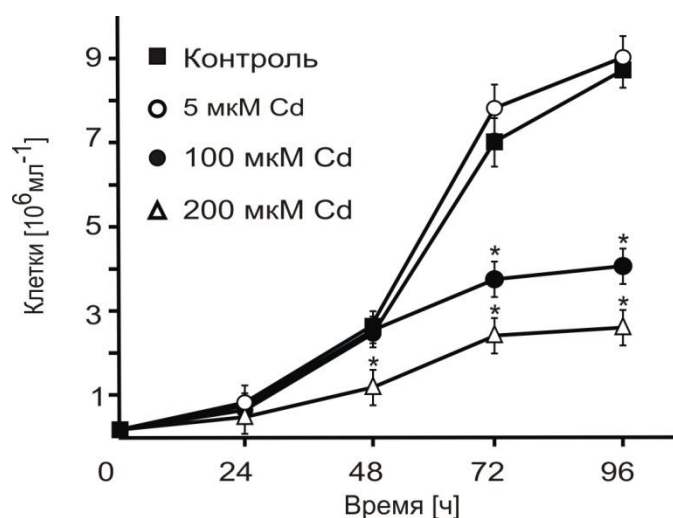
Таблица 1. Химический состав растворов, являющихся компонентами среды TAP.

Компоненты TAP	Состав, г/л
Раствор А	NH <sub>4</sub> Cl – 15; Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 4,0; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O – 2,0. В опытах инкубации культур в среде TAP, не содержащей серу, Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O заменяли на Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 4,3.
Фосфатный буфер	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 93,5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 63,0.
Раствор микроэлементов	ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) – 50; ZnSO <sub>4</sub> – 22; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> – 11,4; MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O – 5,06; FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 4,99; CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 1,61; CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O – 1,57; (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O – 1,1. В опытах инкубации культур в среде TAP, не содержащей серу, ZnSO <sub>4</sub> был заменен на ZnCl <sub>2</sub> – 10; FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – на FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O – 3,6; CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O – на CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O – 1.

Культивирование культур осуществлялось в режиме непрерывного освещения белым светом (освещенность ~ 45 мкмоль/м<sup>2</sup>/с) при 22°C, в течение 72 ч. В ходе экспериментов для поддержания активного состояния клеток культуры пересевались каждые 72 часа. Плотность культур измеряли микроскопическим путем подсчета количества клеток в камере Горяева под световым микроскопом при увеличении 100х и 400х. Жизнеспособность клеток оценивалась путем их окрашивания 0,05% (V/V) красителем Evans Blue

(DIA-M, Russia) и дальнейшим подсчетом процента неокрашенных (жизнеспособных) клеток с помощью камеры Горяева (Crutchfield et al., 1999).

В опытах по изучению действия катионов кадмия на синтез и активность АОХ1 была использована конечная концентрация хлорида кадмия  $\text{CdCl}_2$  (100 мкМ), которая приводила к 50% сокращению числа клеток в популяции (Рис. 8). В ходе экспериментов культуры *C.reinhardtii* cw15-325, выращенные несинхронно в среде ТАР при 22°C до логарифмической фазы ( $1\text{--}2 \cdot 10^6$  кл/мл), центрифугировали и ресуспендировали в среде ТАР с добавлением 100мкМ  $\text{CdCl}_2$ . Культуру разделяли на два образца: один инкубировали в темноте, второй – на свету. Отбор проб для выделения тотальной РНК и белка из клеток производили после инкубирования в присутствии  $\text{CdCl}_2$  через 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 24 и 48 часов. В экспериментах по анализу воздействия экзогенных активных форм кислорода аликвоты клеток были взяты через 1, 3 и 5 часов после добавления в культуры 1мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Контрольные культуры инкубировали в среде без добавления  $\text{CdCl}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Рис. 8.** Действие кадмия на рост *C. reinhardtii* cw15-325. Достоверные в отношении контроля различия обозначены \*.

Для создания условий голодания по сере в культуральной среде клетки *C. reinhardtii* cw15-325, выращенные до логарифмической фазы роста ( $2 \cdot 10^6$  кл/мл) несинхронно в среде ТАР при 22°C на свету, переносили в среду ТАР, не содержащую серу, приготовленную соответственно протоколу (см. табл. 1, Hemschemeier et al. 2009).

Для анализа отсутствия меди в среде клетки *C. reinhardtii* cw15-325 культивировали в ТАР ENEA2. Данная среда отличается от ТАР количественным содержанием микроэлементов и ЭДТА (см. табл. 2, Ferrante et. al., 2008).

Таблица 2. Концентрация микроэлементов (мкМ) в средах ТАР и ТАР ENEA2.

Микроэлемент	Необходимый минимум	ТАР	ТАР ENEA2
Zn	1,7	77	3
Mn	1,7	26	3
Fe	5	18	5
Co	0,003	7	0,1
Cu	0,3	6	0,3
Mo	0,003	1	0,1
ЭДТА	-	134	15

Концентрация катионов меди в среде ТАР ENEA2 соответствует необходимому минимуму. Помимо этого, в среду ТАР ENEA2 для связывания ионов меди  $\text{Cu}^{+2}$  дополнительно вносили хелатор меди ТЕТА (триэтиленetetрамин) в концентрации 10 мкМ.

Для создания условий аноксии были использованы два экспериментальных подхода. В экспериментах, названных «темнота и аноксия» и «темнота и аэробноз», культуры росли при 22°C до логарифмической фазы ( $2-2,5 \cdot 10^6$  кл/мл) в стеклянных колбах, объемом 1 литр. Затем, для эксперимента «темнота и аноксия» аликвоты культуры, объемом 50 мл, переносили в герметично закрывающиеся стеклянные колбы, объемом 50 мл, и инкубировали в темноте. Таким образом, условия аноксии достигались постепенным снижением уровней растворенного кислорода за счет дыхательной активности организма. Условия для опыта «темнота и аэробноз» достигались путем инкубации 50 мл суспензии клеток в стеклянных стаканах, емкостью 250 мл, слабо прикрытых алюминиевой фольгой. Оба эксперимента выполнялись параллельно с одной культурой при каждом биологическом повторе.

## 2.3. Количественный анализ экспрессии генов

### 2.3.1. Выделение тотальной РНК

15 мл суспензии вегетативных клеток *C. reinhardtii* из логарифмической фазы роста осаждали центрифугированием (5000g, 5 мин), ресуспендировали в 0,5 мл тризола (Trizol) (Invitrogen, США) и перемешивали на вортексе. Гомогенизат инкубировали 5 мин при комнатной температуре, добавляли 0,1 мл хлороформа, интенсивно встряхивали 15 сек и вновь инкубировали 2-3 мин при комнатной температуре. Смесь центрифугировали (12000g, 15 мин, 4 °C), верхнюю водную фазу отбирали в новый эппендорф и добавляли

0,25 мл изопропилового спирта. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали (12000g, 10 мин, 4 °C). Супернатант удаляли, к осадку добавляли 0,5 мл 75° этилового спирта, перемешивали на вортексе и центрифугировали (7500g, 5 мин, 4 °C). Осадок высушивали и растворяли в воде, обработанной DEPC (диэтилпиروкарбонат – ингибитор рибонуклеаз (ферменты-нуклазы, катализирующие гидролиз фосфодиэфирной связи между субъединицами РНК)) (Amresco, США). Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре (SmartSpec Plus, BioRad, США). Пробы выделенной тотальной РНК хранили при -70 °C.

### 2.3.2. Синтез одноцепочечной кДНК

Перед синтезом кДНК для удаления следовых количеств ДНК из проб РНК (1 мкг) обрабатывали ДНКазой I (50 е.а./мкл) (ThermoScientific, США) при 37°C в течение 15 мин в конечном объеме равном 10 мкл, доведенным DEPC-водой. Инактивировали ДНКазу I добавлением 0,43 мкл 50 мМ EDTA и нагреванием до 80°C в течение 10 мин.

Одноцепочечная кДНК была получена на матрице РНК с использованием набора для обратной транскрипции (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, ThermoScientific, США). Для синтеза первой цепи кДНК к 1 мкг РНК добавляли 0,5 мкл Oligo(dT)<sub>18</sub> и инкубировали 5 мин при 65°C. Затем реакционная смесь состояла из 5X реакционный буфера, 10 мМ смеси dNTP, ингибитор РНКазы, обратной транскриптазы 200 е.а./мкл и DEPC-воды. Программа синтеза осуществлялась при 42°C в течение 60 мин с последующей инактивацией фермента при 70°C в течение 10 мин.

### 2.3.3. ПЦР в режиме реального времени

Реакции количественной ПЦР в режиме реального времени проводили в белых тонкостенных пробирках для ПЦР, стрипованных по 8 штук, с оптически прозрачными крышками (Bio-Rad, США) с использованием флюоресцентного красителя SYBRGreen I (Invitrogen™) для визуализации синтеза двухцепочечных ДНК в амплификаторе LightCycler CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала следующие компоненты:

10X реакционный буфер	2 мкл
50 мМ раствор MgCl <sub>2</sub>	1 мкл
0,0001X раствор SYBRGreenI в DMSO (диметилсульфоксид) (Amresco, США)	1 мкл
0,5 мМ смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов	0,8 мкл

HotStart Taq полимеразa (5 е.а./мкл)	0,08 мкл
10 мкМ смесь прямого и обратного праймеров	0,05 мкл
кДНК	250 нг
Стерильная вода	до 20 мкл

Режим полимеразной цепной реакции включал следующие этапы:

1. денатурация ДНК в течение 5 мин при 96°C;
2. последующие 40 циклов, состоящие из стадии денатурации ДНК (96°C 30 сек), стадии отжига праймеров (60°C 30 сек) и стадии синтеза цепи ДНК (72°C 1 мин);
3. охлаждение 4°C.

Каждая реакция ПЦР выполнялись в трех повторах на пробах из трех биологических выделений. Контроли без матрицы были включены. В качестве контроля использовался ген *CBLP C. reinhardtii* (Mus et al., 2007), кодирующий  $\beta$ -субъединицу G-белка.

Все использованные в работе праймеры для количественной ПЦР в режиме реального времени давали эффективность реакции  $\geq 90\%$  и единственный пик на кривой плавления. Последовательности праймеров, использовавшихся в ходе экспериментов, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Последовательности праймеров для амплификации

Праймер		Последовательность (5'-3')
<i>AOX1</i>	прямой	ACTTGGATCTGTGTGCCTGG
<i>AOX1</i>	обратный	CTGGGCCGGTATCTACGTTC
<i>AOX2</i>	прямой	GAGTTTCAGGACCCGGATGG
<i>AOX2</i>	обратный	AATAAACCGCAACCCCAGGT
<i>FDX5</i>	прямой	CGGCTTCATCCTCATGTGCT
<i>FDX5</i>	обратный	ACGCTGACACGAATGGTACG
<i>CRR1</i>	прямой	TGCGTGTTTGTTGTTTCAGG
<i>CRR1</i>	обратный	GCCAGGTGTGATGGAGAGAC
<i>CBLP</i>	прямой	CTTCTCGCCCATGACCAC
<i>CBLP</i>	обратный	CCCACCAGGTGTTCCTTCAG
<i>MSD3</i>	прямой	GGAGATTGTCAGCCAGATCG
<i>MSD3</i>	обратный	GGAGGAGTTGAAGGTGGTCA

Для оценки специфичности амплификации с использованием программного

обеспечения прибора были сняты кривые плавления продуктов амплификации со следующими параметрами: температура – от 65 до 95°C, шаг 0,2°C, время удержания 0,5 сек. Значения  $C_t$  определялось как номер цикла, на котором флюоресцентный сигнал реакции пересекает базовую линию, с использованием программного обеспечения CFXManager. Относительная разница уровней экспрессии генов вычислялась по формуле:

$$\Delta\Delta = 2^{\Delta C_t(\text{опыт}) - \Delta C_t(\text{контроль})}.$$

Для статистической обработки полученных данных использовался пакет офисных программ Microsoft Excel 2010.

## 2.4. Вестерн-блоттинг

Для выделения тотального белка из клеток *C. reinhardtii* 10 мл культуры, содержащей  $5 \times 10^6$  кл/мл, осаждали центрифугированием (3500 об/мин, 5 мин, 4°C). Супернатант сливали, а осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл раствора А (0,1 М ДТТ (дителиотреотол), 0,1М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), затем добавляли 200 мкл раствора В (5% SDS, 30% сахарозы). Гомогенизировали смесь путем перемешивания на вортексе в течение 20 минут при комнатной температуре. Получившуюся смесь центрифугировали (13000 об/мин, 2 мин, 4°C), и супернатант, содержащий растворимые белки, переносили в новую пробирку типа эппендорф.

Концентрацию белка проводили методом, основанном на использовании красителя амидо-черного 10 В, сульфогруппа которого, взаимодействуя с амино-группой белков, обеспечивает осаждение белков, но не свободных аминокислот (Porov et al., 1975). Полученный при выделении тотального белка супернатант, содержащий растворимые белки, смешивали с 0,5% раствором амидо-черного в 90% метаноле и 10% уксусной кислоте. Смесь центрифугировали (12500 об/мин, 10 мин, 10°C). Осадок белка трижды отмывали смесью 90% метанола и 10% уксусной кислоты, затем растворяли в 0,2н NaOH. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре (SmartSpec Plus, BioRad, США) при длине волны 615 нм. Для построения калибровочной кривой использовали растворы известных концентраций бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Уровни АOX1 белков в клетках оценивали методом Вестерн-блоттинга. Разделение белков проводили методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) с добавлением ионного детергента - додецилсульфат натрия (SDS) (Laemmli, 1970). Разделяющий гель состоял из: 12% смеси акриламида/бисакриламида (29:1), 0,11% SDS,

0,06% персульфата аммония, 0,00085% TEMED (тетраметилэтилендиамин), 0,43М трис-HCl pH=8,8. В состав концентрирующего геля входили: 0,0625М трис-HCl pH=6,8, 3% смесь акриламид/бисакриламид (29:1), 0,05% SDS, 0,025% персульфат аммония, 0,0005% TEMED. Белковый электрофорез проводили в трис-глициновом буфере, состоящем из 0,003% трис, 0,0144% глицина ( $C_2H_5NO_2$ ), 0,1% SDS, pH=8,3. Электрофорез проводили с использованием мини-камеры для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad, США) в течение 90 минут под напряжением 100 V.

Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану (Protran NC, Amersham) проводили полусухим методом в течение 60 минут при напряжении 20 V в буфере для переноса, состоящем из 0,025 М трис, 0,192 М глицина, 20% метилового спирта ( $CH_3OH$ ), с использованием системы Транс-блот (BioRad, США).

Блокирование неспецифического связывания антител с мембраной проводили путем инкубации в 5% эмульсии обезжиренного сухого молока (Sigma, США) в трис-солевом буфере TBS (0,02М трис pH=7,4, 0,009% NaCl) с добавлением 0,1% неионного детергента Tween 20 в течение 1 часа при постоянном перемешивании. После этого в течение 2 часов мембрана подвергалась гибридизации с первичными антителами к АОХ1 - СтАОХ1, разведение 1:10000 (Agrisera, арт. №: AS06 152, Швеция). На следующем этапе проводили гибридизацию мембраны с вторичными антителами кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:10000) (Sigma, США) при постоянном перемешивании в течение 1 часа.

Детекцию пероксидазной активности проводили с помощью хемилюминисцентного субстрата (Roche). Для регистрации сигнала использовали рентгеновскую пленку (Kodak). После экспозиции пленки в темноте в течение 1 часа, ее проявляли. Проявитель: метол ( $C_7H_{10}NO$ ) $_2$ SO $_4$  5 г/л, метабисульфит калия  $K_2S_2O_5$  0,55г/л, гидрохинон  $C_6H_4(OH)_2$  6 г/л, сульфит натрия безводный  $Na_2SO_3$  30г/л, карбонат натрия  $Na_2CO_3$  30 г/л, бромид калия KBr 0,6г/л), закрепитель: тиосульфат натрия  $Na_2S_2O_3$  240г/л, сульфит натрия  $Na_2SO_3$  15г/л, концентрированная серная кислота  $H_2SO_4$  2 мл/л.

## 2.5. Получение штамма со сниженным уровнем мРНК CRR1

### 2.5.1. Конструирование последовательностей олигонуклеотидов, специфичных к CRR1

Прямую (amiFor\_CRRR1) и обратную (amiRev\_CRRR1) последовательности одноцепочечных олигонуклеотидов (ssDNAoligo), длиной 90 нуклеотидов, необходимых для получения микроРНК, специфичных к *CRR1* *C. reinhardtii*, конструировали по



протоколу (Molnar et al. 2009), используя программу WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org>). Нуклеотиды, обозначенные заглавными буквами, указывают на последовательности amiRNA\*/amiRNA.

amiFor_CRR1	5'-ctagtCTGCGAGTTTTTGACAAATGAtctcgctgacggcaccatgggggtggtggtgacgagcgaTCATATGTCAAAAACCTCGCAGg-3'
amiRev_CRR1	5'-ctagcCTGCGAGTTTTTGACATATGAtagcgctgacaccaccaccccatggtgccgacgagcagaTCATTTGTCAAAAACCTCGCAGa-3'

### 2.5.2. Клонирование двухцепочечной ДНК для экспрессии искусственных микроРНК

**Отжиг** прямого и обратного одноцепочечных олигонуклеотидов проводили при 99°C в течение 5 минут в термомиксере (Eppendorf, США), в результате чего образовывался двухцепочечный фрагмент (dsDNAoligo) с *CRR1*-нацеливающимися последовательностями и сайтами для рестриктазы SpeI. Реакционная смесь, объемом 40 мкл, состояла из 20 мкл 2× буфера (20мМ трис pH=8,0; 2 мМ ЭДТА; 100 мМ NaCl) и по 10 мкл 100 мкМ водных растворов amiFor\_CRR1 и amiRev\_CRR1. Затем в течение ночи охлаждали реакцию смесь. На следующий день процедуру очистки смеси от остаточных концентраций солей буфера проводили с помощью набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия).

**Фосфорилирование** двухцепочечного олигонуклеотида осуществляли в течение 60 минут при 37°C в реакционной смеси, объемом 10 мкл, в состав которой входили: 0,7 мкг двухцепочечного олигонуклеотида, 1 мкл T4 DNA лигазного буфера (Fermentas, США), 1 е.а. полинуклеотидкиназы фага T4 (PNK, Fermentas, США) и 7 мкл стерильной воды. Инактивировали фермент в течение 20 минут при 65°C.

**Клонирование.** В ходе эксперимента использовали плазмидный вектор pChlamiRNA3, длиной 6320 пар нуклеотидов. На первом этапе рестрикции кольцевой молекулы плазмиды, реакцию смесь, объемом 30 мкл, содержащую 2 мкг pChlamiRNA3, 3 мкл 10-кратного буфера H, 1 е.а. рестриктазы SpeI (Fermentas, США) и 16 мкл воды, выдерживали в течение 1 часа при 37°C, затем инактивировали фермент при 65°C в течение 20 минут.

После этапа рестрикции для предотвращения замыкания вектора на себя проводили процедуру дефосфорилирования путем добавления в реакционную смесь 20 е.а. термочувствительной щелочной фосфатазы кишечника телят (CIAP, Invitrogen, США) и инкубации в течение 1 часа при 37°C.

Процедуру очистки линейризованного и дефосфорилизованного вектора pChlamiRNA3 проводили в два этапа. На первом этапе методом электрофореза в 1% агарозном геле с использованием флуоресцирующего и интеркалирующего в ДНК красителя SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, США) разделяли реакционную смесь по фракциям. Процедуру проводили в камере для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США) при напряжении 150V в течение 30-60 минут. На следующем этапе линейризованный дефосфорилированный вектор выделяли из агарозного геля с помощью набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия) согласно протоколу.

Этап лигирования фосфорилированного двухцепочечного олигонуклеотида (dsDNAoligo) и линейризованного дефосфорилированного плазмидного вектора (pChlamiRNA3) проводили в реакционной смеси, содержащей 20 нг вектора, 7 нг двухцепочечного олигонуклеотида, 2 мкл 5x буфера для быстрого лигирования (Fermentas, США), 5 е.а. ДНК лигазы фага T4 (Fermentas, США), 6 мкл стерильной воды. Инкубацию проводили в течение 15 мин при комнатной температуре.

### **2.5.3. Отбор amiRNA-клонов, содержащих вставку в ориентации, необходимой для экспрессии**

**Получение компетентных клеток *Escherichia coli*.** Для получения компетентных клеток *Escherichia coli* использовали метод обработки хлористым кальцием ( $\text{CaCl}_2$ ). Колонию *E.coli* DH-5 $\alpha$  засекали в 2 мл жидкой среды LB (бактотриптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л, pH =7.5) и выращивали при покачивании при 37°C в течение ночи. 1 мл полученной культуры инокулировали в 100 мл среды LB и инкубировали при интенсивном покачивании при 37°C до достижения оптической плотности  $A_{600}$  0,25-0,3. В течение 15 минут культуру охлаждали на льду, затем осаждали клетки центрифугированием (3300 g, 10 мин, 4°C), супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в 30-40 мл холодного 0,1М раствора  $\text{CaCl}_2$  и оставляли на льду в течение 30 мин. Далее суспензию центрифугировали (3300 g, 10 мин, 4°C), удаляли супернатант, а клетки ресуспендировали в 6 мл раствора, содержащего 0,1М  $\text{CaCl}_2$  и 15% глицерина. Аликвоты, объемом по 0,1 мл, вносили в стерильные микроцентрифужные пробирки и замораживали при -70°C.

**Трансформация.** Замороженные при -70°C в стерильных микроцентрифужных пробирках клетки *E.coli* DH-5 $\alpha$  размораживали на льду в течение 15 минут. Далее в суспензию клеток, объемом 0,1 мл, добавляли 2,5 мкл лигазной смеси

(pChlamiRNA3CRR1), перемешивали постукиванием пальцем по пробирке и оставляли на льду в течение 30 минут. Затем в течение 1 минуты суспензию клеток выдерживали при 42°C в термомиксере (Eppendorf, США), после чего 2 минуты охлаждали на льду. В пробирку добавляли 0,6 мл среды LB и инкубировали в термомиксере (Eppendorf, США) при покачивании 950 об/мин при 37°C в течение 1 часа. На следующем этапе с помощью стеклянного шпателя клонированные клетки *E.coli* DH-5α (по 50 мкл на 1 чашку Петри) высевали на чашки Петри с 2% агаризованной средой LB, содержащей селективный антибиотик ампициллин (100 мг/л). Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение ночи. В выросших клонах, содержащих конструкцию pChlamiRNA3CRR1, анализировали правильность ориентации вставки двухцепочечного олигонуклеотида в плазмидный вектор с помощью метода ПЦР из колоний по наличию ампликона, размером 182 пар оснований. В состав реакционной смеси, объемом 10 мкл, входили:

10x буфер для Taq-полимеразы (Sibenzyme, Россия)	1 мкл
50 mM раствора MgCl <sub>2</sub>	0,24 мкл
0,5 mM смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов	0,2 мкл
100μM праймера AmiRNAprec <sub>for</sub> (5'-GGTGTGGGTCGGTGTGTTTTG-3')	0,1 мкл
100μM праймера Spacer <sub>rev</sub> (5'-TAGCGCTGATCACCAACACCC-3')	0,1 мкл
1% раствор детергента W-1 (Invitrogen, США)	0,375 мкл
HotStartTaq полимераз (Сибэнзим, Россия; 5 е.а./мкл)	0,1 мкл
Стерильная вода	7,885 мкл

Каждую колонию *E.coli* DH-5α вносили в отдельную пробирку для ПЦР с реакционной смесью и ресуспендировали клетки с помощью автоматической пипетки. ПЦР проводили в термоциклере MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Режим полимеразной цепной реакции включал следующие этапы:

1. денатурация ДНК в течение 5 мин при 96°C;
2. последующие 40 циклов, состоящие из стадии денатурации ДНК (96°C 30 сек), стадии отжига праймеров (60°C 30 сек) и стадии синтеза цепи ДНК (72°C 1 мин);
3. охлаждение 4°C.

Для визуализации результатов ПЦР проводили электрофорез продуктов амплификации в 2% агарозном геле с использованием красителя SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, США) в камере для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США) при напряжении 150V в течение 30-60 минут. Наличие ампликона

визуализировали с использованием системы гель-документации BioDoc IT Imaging System (Канада).

Для анализа вставки необходимой последовательности в плазмидный вектор проводили секвенирование плазмид, выделенных из клеток *E.coli* DH-5 $\alpha$ . Процесс проводили на автоматическом секвенаторе (модель 3500xL Genetic Analyzer, LifeTechnologies, США) с использованием стандартных для pChlamiRNA3 праймеров AmiRNAprec<sub>for</sub> и Spacer<sub>rev</sub> и набора для секвенирования BigDye (R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, (LifeTechnologies, Thermo Fisher Scientific, США). Реакции секвенирования выполнялись на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета.

#### 2.5.4. Трансформация *C. reinhardtii*

После выбора клонов *E. coli* DH-5 $\alpha$ , содержащих в плазмиде необходимую вставку, проводили выделение и очистку плазмидной ДНК согласно протоколу (Евроген, Россия). Для линейаризации выделенной плазмиды рестрикционную смесь объемом 40 мкл, содержащую 10 мкг плазмиды, 4 мкл 10-кратного буфера для KpnI (Fermentas, США), 5 мкл KpnI (10 е.а./мкл, Fermentas, США) и воду, выдерживали в течение 1 ч при 37°C, а затем течение 20 мин при 80°C для инактивации фермента.

Клетки *C.reinhardtii* штамм CW15-325 трансформировали с использованием метода встряхивания со стеклянными шариками (Kindle, 1990). Для трансформации клетки *C.reinhardtii* cw15-325 выращивали до концентрации  $2 \times 10^6$  кл/мл, осаждали центрифугированием (5 мин, 5000 об/мин) и ресуспендировали в среде ТАР. К  $2 \times 10^7$  клеток, ресуспендированных в объеме 300 мкл, добавляли 2 мкг линейаризованной плазмиды и 300 мг стеклянных шариков диаметром 0,55 мм. Смесь встряхивали в течение 20 сек на вортексе, после чего вносили 10 мл среды ТАР и выдерживали при постоянном освещении при температуре 40°C в течение 1 часа, а затем при 23°C в течение 24 часов. Затем клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 2000g), супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в 0,5 мл среды ТАР. В суспензию клеток вносили 3,5 мл расплавленной и остуженной до 42°C среды ТАР с 0,5% агара, перемешивали и переносили на чашки Петри со средой ТАР с 2% агара и селективным антибиотиком паромомицином в концентрации 10 мг/л. Для обора штаммов со сниженным содержанием мРНК CRR1 использовался метод количественной ПЦР.

## 2.6. Измерение дыхания клеток

Измерение общего, цитохромного и альтернативного дыхания клеток *C. reinhardtii* осуществляли в непроточной камере с использованием кислородного электрода Кларка (Oxygraph, Россия) в темноте при 22°C, оценивая скорость поглощения растворенного кислорода. Электрод предварительно калибровали в камере при температуре эксперимента. За 100% принималось значение концентрации кислорода в насыщенной воздухом в течении 30 минут деионизированной воде. Путем добавления избытка сульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) в камере достигали полного удаления кислорода, что соответствовало 0%. Интенсивность общего дыхания регистрировалась после инкубирования 8 мл исследуемой культуры ( $2 \times 10^6$  кл/мл) в течение 5 минут в темноте при 22°C. Скорость поглощения кислорода за счет функционирования альтернативного пути рассчитывали после внесения 1 мМ цианида калия (KCN) (Fluka, China), ингибирующего цитохромоксидазный комплекс. Доля цитохромного дыхания высчитывалась после внесения 2 мМ салицилгидроксамовой кислоты (SHAM) (Aldrich, USA), блокирующей альтернативную оксидазу. В присутствие обоих ингибиторов измеряли остаточную скорость поглощения кислорода (Maxwell et al., 2002; Vanlerberghe, 2013). Измерения проводили в трех биологических повторах.

## 2.7. Измерение активных форм кислорода (АФК)

Образование активных форм кислорода при воздействии на клетки катионов кадмия измерялось на основе взаимодействия 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетата ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) с внутриклеточной перекисью водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) согласно протоколу (Maxwell, et al. 1999). Оценку интенсивности флуоресценции проводили на микропланшетном спектрофлуориметре (Agilent Cary Eclipse) при длинах волн 493 и 530 нм (длин волн возбуждения и эмиссии, соответственно) на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета. Клетки *C. reinhardtii* cw15-325, выращивали до концентрации  $2 \times 10^6$  кл/мл, инкубировали с 20 мМ  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  в течение 15 минут. Затем клетки осаждали центрифугированием (3000g, 5 минут) и ресуспендировали в 1мл ТАР. Формирование АФК измеряли в клетках, подвергнутых воздействию кадмия на свету или в темноте в течение 1, 2, 3 и 4 ч. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в ТАР. Пробы  $1,5 \times 10^6$  кл/мл вносились в черный, культуральный, плоскодонный, 96-луночный планшет (370мкл/лунку).

## 2.8. Анализ активности каталазы

Оценку активности каталазы проводили согласно протоколу (Aksmann et al., 2014). Культуру *C. reinhardtii* cw15-325 ( $2 \times 10^6$  кл/мл) осаждали центрифугированием (5 мин, 3000g) и ресуспендировали в буфере (0,05 М калий-фосфатный буфер pH=7,8), в состав которого входили ингибиторы протеаз: 0,01 М ЭДТА, 0,01 М ДТТ, 0,1 М ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид). Суспензию гомогенизировали методом встряхивания со стеклянными шариками в течение 20 секунд в гомогенизаторе Minilys (Bertin Technologies). После центрифугирования (20 минут, 20000g, 4 °C) осадок удаляли, а в полученном супернатанте определяли концентрацию белка с использованием амидо-черного 10В. В реакционной смеси, состоящей из 50 мМ натрий-фосфатного буфера pH=7,0 и 10 мМ  $H_2O_2$ , определяли ферментативную активность каталазы. На спектрофотометре (SmartSpec Plus, BioRad, США) регистрировали мониторинг снижения поглощения при длине волны 240 нм, вызванного разрушением  $H_2O_2$  (Aebi, 1984). Активность рассчитывалась в мкМ потребленного  $H_2O_2$  за 1 минуту на 1 мг белка. Измерения были проведены на трех различных культурах (биологические повторы).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Действие кадмия на синтез и активность альтернативной оксидазы АОХ1

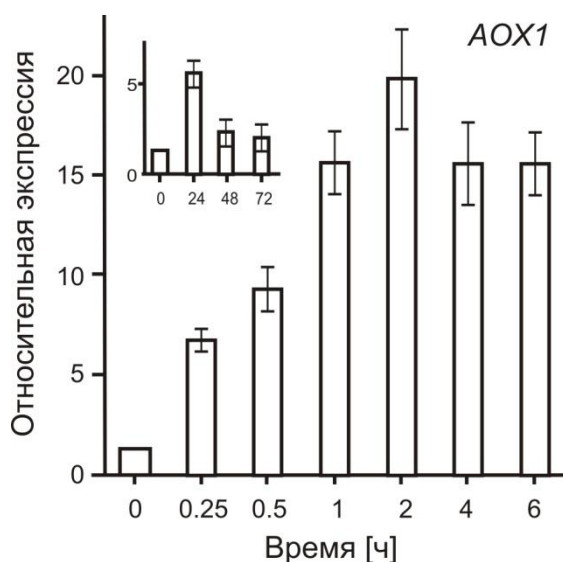
В предыдущих работах было установлено увеличение доли альтернативного дыхания у одноклеточной зеленой водоросли *Euglena gracilis* в результате стрессового воздействия катионов кадмия на клетки (Castro-Guerrero et al., 2008). В связи с этим, возник вопрос, не происходит ли изменения транскрипции гена *AOX1*, синтеза АОХ1-белка и доли цианид-резистентного пути дыхания в ответ на действие кадмия у *C. reinhardtii*?

#### 3.1.1. Действие кадмия на транскрипцию гена *AOX1*

Для анализа действия катионов кадмия необходимо было установить концентрацию, приводящую к 50% снижению числа клеток в популяции. Как видно из данных рис. 9, внесение 100 мкМ  $\text{CdCl}_2$  приводило к 2-кратному снижению концентрации клеток после 72 часов экспозиции, однако не действовало на жизнеспособность клеток.

На первом этапе было проанализировано, происходит ли индукция транскрипции *AOX1*-гена после внесения в среду кадмия. Во избежание действия света опыт проводили в темноте. Анализировали кратковременное (0-6 ч) и долговременное (0-72 ч) действия кадмия на транскрипцию гена с помощью метода количественной ПЦР (Рис. 9). В среде, содержащей 100 мкМ  $\text{CdCl}_2$ , увеличение уровней транскриптов *AOX1* фиксировалось через 15 минут и достигало максимального 20-кратного увеличения в течение 2-х часов от начала экспозиции. После 4-х часов экспозиции уровень транскрипции снижался до 15 и оставался таким на протяжении следующих 2-х часов. При дальнейшем воздействии  $\text{CdCl}_2$  на клетки уровень экспрессии гена уменьшался и через 24 часа был в 5 раз выше значений в контрольной пробе. После 48 часов уровень транскрипции опускался до 1,6 и оставался таким на протяжении еще 24 часов (Рис. 9. Вставка).

Таким образом, полученные данные дали основания заключить, что при создании условий, исключающих действие световых сигналов, можно непосредственно фиксировать кадмий-индуцированную активацию транскрипции *AOX1*.



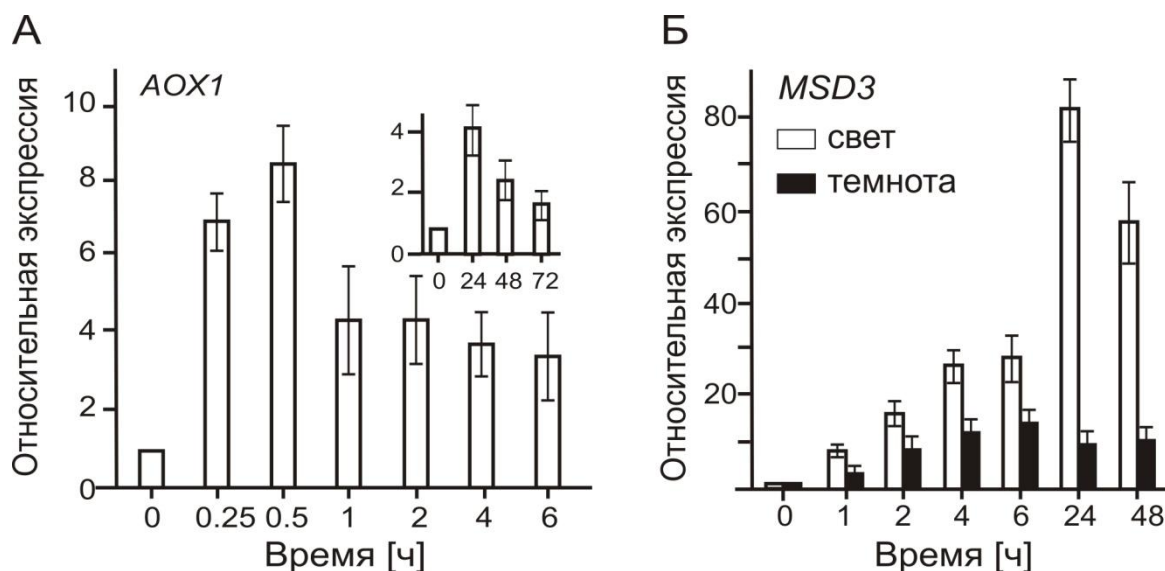
**Рис. 9.** Действие катионов Cd на относительную экспрессию гена *AOX1* в клетках, инкубированных в темноте.

Ранее было установлено, что кадмий снижает фотосинтетическую активность у *C. reinhardtii* (Gillet et al., 2006). У высших растений показано участие альтернативных оксидаз в оптимизации процессов фотосинтеза (Vishwakarma et al., 2015). В этой связи на следующем этапе было проверено, вовлечены ли световые сигналы в Cd-зависимый контроль транскрипции *AOX1* у *C. reinhardtii*. Как видно из полученных результатов (Рис. 10 А), уже через 15 и 30 минут уровень транскрипции увеличивался в 6 и 8 раз по сравнению с контролем, соответственно, через 1 час уменьшался в два раза и оставался на этом уровне в течение последующих 24 часов (Рис. 10 А. Вставка). После 48 часов экспозиции наблюдалось 2-кратное снижение уровня экспрессии гена. Несмотря на то, что профили экспрессии *AOX1* на свету и в темноте были идентичны, наблюдалась существенная разница в кратности увеличения относительно контроля. Так, при инкубации клеток на свету в среде с  $\text{CdCl}_2$  уровень транскрипции *AOX1* возрастал в среднем в 2-8 раз, тогда как обработка  $\text{CdCl}_2$  в темноте приводила к 10-15-кратному увеличению уровней транскрипции *AOX1*. Более того, максимальные уровни транскрипции гена не совпадали во времени: в присутствии света максимум достигался в течение первых 15 минут, в темноте – через 2 часа стрессового воздействия (Рис. 10., Рис. 11 А).

В качестве контроля был использован ген *MSD3*, кодирующий супероксиддисмутазу MnSOD3 хлоропласта, которая индуцируется в ответ на присутствие кадмия в среде (Рис. 10 Б, Aksmann et al., 2014). Согласно полученным результатам, в отличие от *AOX1*, транскрипция гена *MSD3* в присутствии кадмия



происходила главным образом на свету.

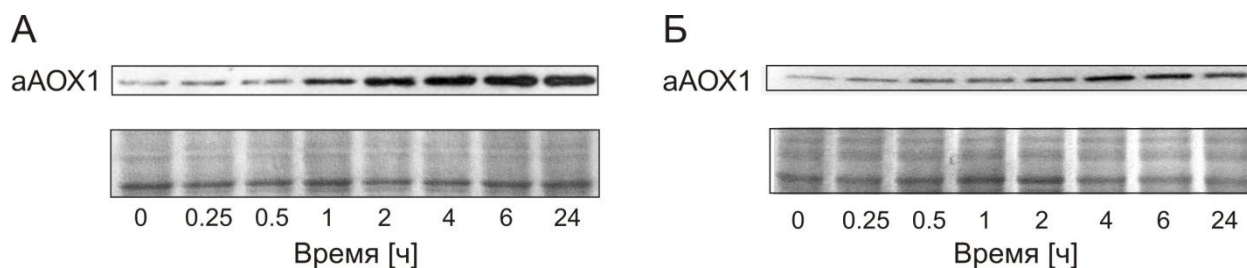


**Рис. 10.** Действие катионов Cd на относительную экспрессию генов *AOX1* (А) и *MSD3* (Б) в клетках. Клетки были инкубированы на свету или в темноте.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что индуцированное кадмием увеличение уровней транскрипции *AOX1* обратно регулируется действием света. Это, по-видимому, может быть отчасти связано с выявленной индукцией *AOX1*-гена в среде ТАР в темноте (Zalutskaya et al., 2016).

### 3.1.2. Действие кадмия на уровни белка AOX1

После выявления индукции транскрипции *AOX1* в ответ на действие кадмия, были проанализированы уровни белка AOX1 в клетках при инкубировании в тех же условиях. Оценку уровней белка AOX1 в клетках, подвергнутых воздействию 100 мкМ CdCl<sub>2</sub> в темноте и на свету проводили методом Вестерн-блоттинга с использованием AOX1-специфичных антител (Рис. 11). Согласно полученным результатам, в клетках, инкубированных в темноте в присутствии 100 мкМ CdCl<sub>2</sub>, уже через 1 час экспозиции наблюдалось значительное возрастание количества белка AOX1, увеличение которого продолжалось при дальнейшей инкубации клеток в присутствии кадмия.

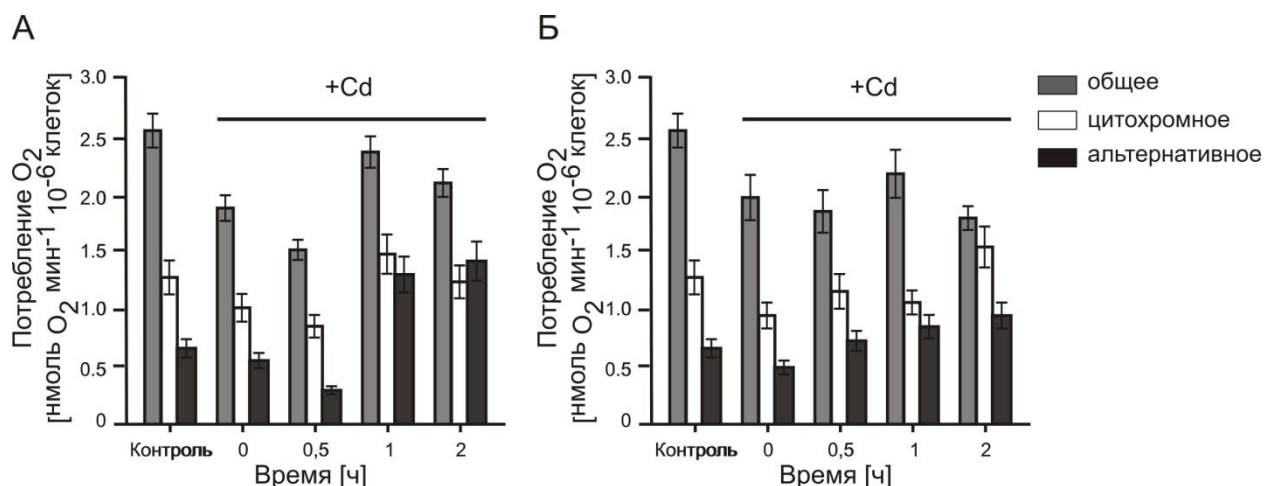


**Рис. 11.** Уровни белка АOX1 в клетках, подвергнутых воздействию 100 мкМ  $\text{CdCl}_2$  в темноте (А) и на свету (Б) Уровни белка в разных вариантах опыта анализировались окрашиванием геля кумасси бриллиантовым синим.

Полученные данные согласуются с результатами уровней транскрипции *AOX1* в ответ на действия кадмия (Рис. 9., Рис. 10., Рис. 11) и, таким образом, подтверждают Cd-индуцированный синтез АOX1.

### 3.1.3. Действие кадмия на АOX-зависимое дыхание

Для оценки физиологической активности АOX1 мы исследовали уровни дыхания в клетках, инкубированных в течение 0,5, 1 и 2 часов в среде ТАР, содержащей 100 мкМ  $\text{CdCl}_2$ , в темноте и на свету (Рис. 12). В условиях темноты после добавления хлорида кадмия в среду процент общего дыхания снижался на 21% и оставался на этом уровне на протяжении как последующих 30 минут. К 2 ч инкубирования клеток с  $\text{CdCl}_2$  происходило восстановление общего и цитохромного путей дыхания. В контрольной пробе доля альтернативного пути дыхания составляла приблизительно 25% от общего дыхания. Однако, в процессе действия кадмия процент альтернативного дыхания возрастал и достигал 26, 36, 53 и 66% от общего через 0, 0,5, 1 и 2 часа, соответственно (Рис. 12 А). Полученные результаты хорошо согласуются с уровнями белка (Рис. 11 А). В присутствии света при действии кадмия также наблюдалось значительное снижение общего пути дыхания. Доля альтернативного дыхания возрастала до 24, 32,4, 35, 47 % от общего дыхания через 0, 0,5, 1 и 2 часа, соответственно.

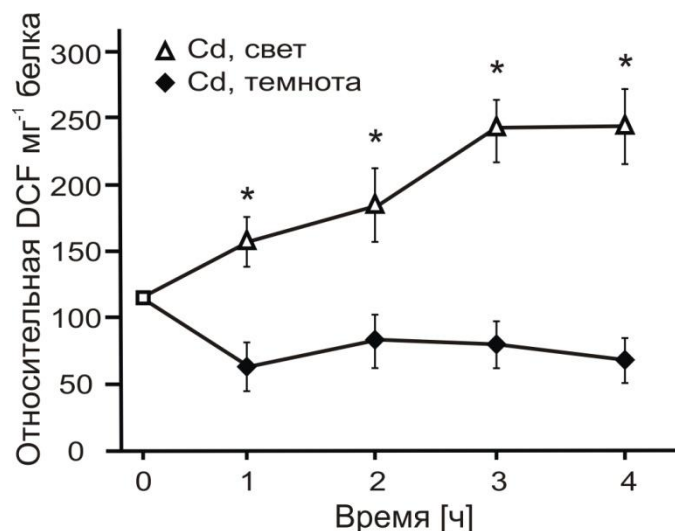


**Рис. 12.** Анализ общего, цитохромного и альтернативного путей дыхания в клетках, инкубированных в среде, содержащей 100 мкМ CdCl<sub>2</sub>, в темноте (А) и на свету (Б).

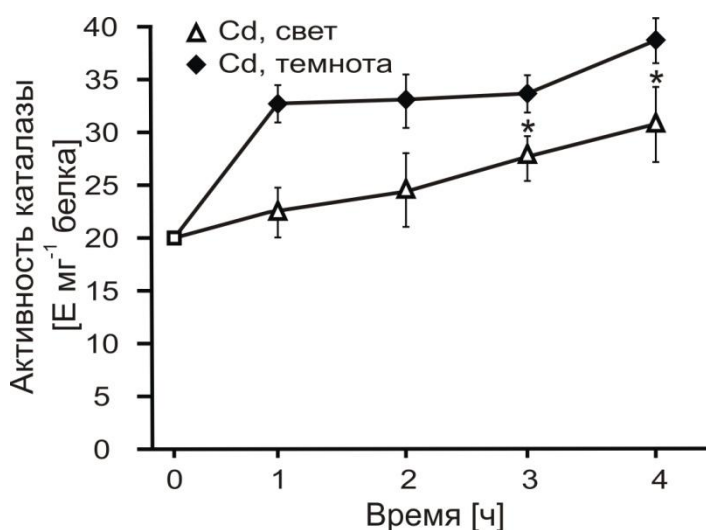
### 3.1.4. Действие кадмия на концентрацию внутриклеточных АФК и активность каталазы

Известно, что действие катионов кадмия на сульфгидрильные, карбоксильные и имидазольные группами в аминокислотных остатках белков приводит к инактивации многих белков, что сказывается на процессах метаболизма, в том числе фотосинтезе и дыхании. У растений это приводит к формированию АФК и, как результат – к окислительному стрессу (Keunen et al., 2011; Cuypers et al., 2010). Ряд авторов считают, что у растений АФК могут функционировать как ключевые регуляторы экспрессии АОХ (Clifton et al., 2006; Rhoads et al., 2006; Rhoads and Subbaiah 2007; Ho et al., 2008). Примечательно, что под воздействием кадмия на свету в клетках *C. reinhardtii* наблюдается накопление одной из форм АФК - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Aksmann et al., 2014). Проведенный нами сравнительный анализ уровней H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках, инкубированных в присутствии кадмия в темноте и на свету (Рис. 13) показал, что внутриклеточная концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 1,6-2,5 раза выше на свету, чем в контроле, в темноте концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> достоверно не менялась.

Ранее сообщалось, что у *C. reinhardtii* активность каталазы выше в клетках, инкубированных в темноте, чем в присутствии света (Shao et al., 2008). Анализ активности каталазы показал, что через 1 ч после добавления в среду кадмия в темноте активность каталазы возрастала более, чем на 60% по сравнению с контролем, тогда как на свету достоверное возрастание активности каталазы фиксировалось через 3-4 часа (Рис. 14).



**Рис. 13.** Действие Cd на формирование перекиси водорода в клетках, инкубированных на свету и в темноте. DCF – флюоресценция дихлорофлуоресцина на единицу белка. Достоверные в отношении контроля различия обозначены \*.

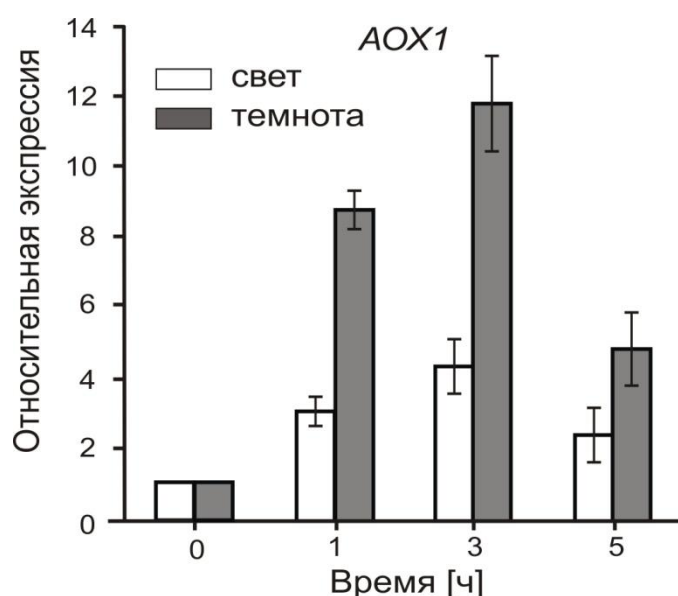


**Рис. 14.** Действие Cd на активность каталазы в клетках, инкубированных на свету или в темноте. Достоверные в отношении контроля различия обозначены \*.

Полученные данные подтверждают результаты измерений уровней внутриклеточной  $H_2O_2$ . В клетках, инкубированных в темноте в присутствии кадмия, активность каталазы в клетках выше, чем в освещенных клетках, результатом чего являются более низкая концентрация  $H_2O_2$ . Таким образом, сигналы, опосредованные светом, отрицательно регулирует ферментативную активность каталазы, что соответственно отражается на высоком значении внутриклеточной  $H_2O_2$ .

Поскольку, в предыдущих исследованиях было показано, что уровни мРНК *AOX1* *C. reinhardtii* увеличиваются в клетках, подвергнутым воздействию экзогенной  $H_2O_2$  в

присутствии света (Molen et al., 2006), на следующем этапе необходимо было сравнить действие экзогенной  $H_2O_2$  на транскрипцию гена в темноте и на свету. Для оценки влияния  $H_2O_2$  на экспрессию *AOX1* мы количественно сравнивали уровни мРНК в обработанных  $H_2O_2$  клетках на свету и в темноте (Рис. 15). Внесение  $H_2O_2$  в суспензию клеток на свету приводила к 3-4-кратному увеличению экспрессии *AOX1*-гена в течение 5-часового периода экспозиции. При инкубировании клеток в темноте наблюдался более высокий уровень транскрипции - в 12 раз через 3 часа.

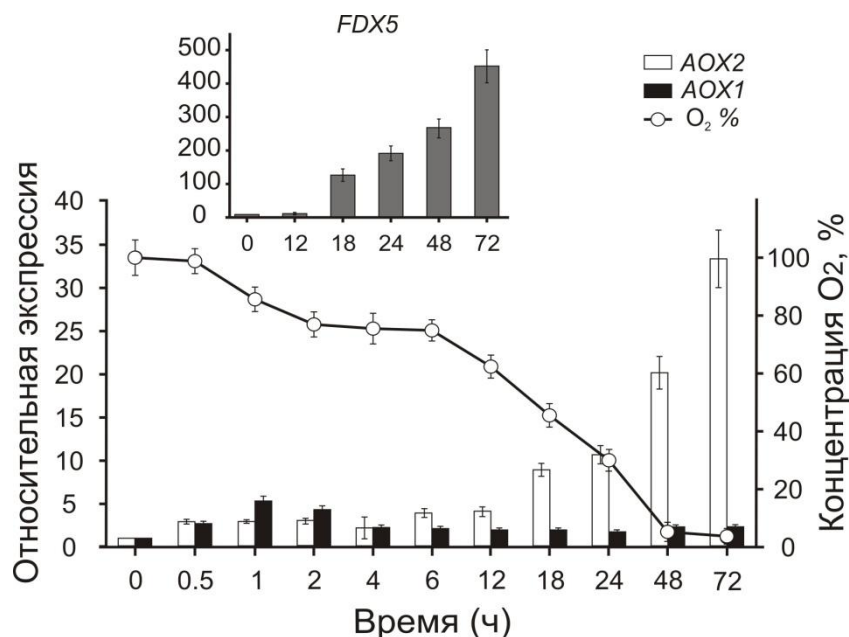


**Рис. 15.** Действие 1 mM  $H_2O_2$  на относительную экспрессию *AOX1* на свету и в темноте.

### 3.2. Действие стрессоров на экспрессию гена *AOX2*

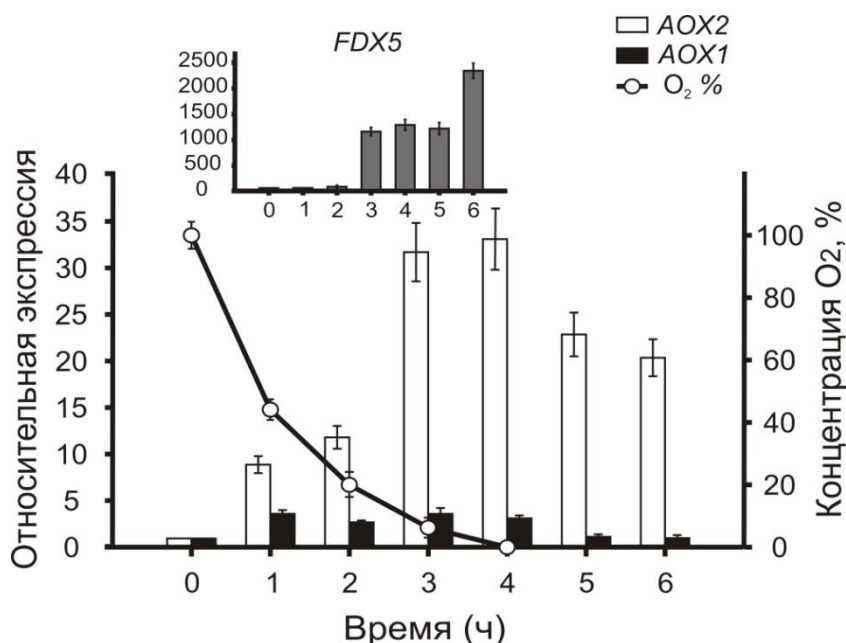
#### 3.2.1 Действие аноксии на транскрипцию гена *AOX2*

Ранее было установлено, что экспрессия *AOX1* активируется в клетках, инкубированных в темноте (Zalutskaya et al., 2016). Возник вопрос, не происходит ли в этих условиях индукции второго гена семейства *AOX2*? Когда клетки *C. reinhardtii* cw15-325, выращенные в присутствии света, переносили в темноту, уровень транскрипции *AOX2* увеличивался приблизительно в 3 раза по сравнению с контролем уже через 30 минут и достигал максимума в 33 раза после 72-х часового воздействия темноты (Рис. 16). Примечательно, что уровень транскрипции *AOX1* был ниже и практически не возрастал после 24 часов инкубации в темноте.



**Рис. 16.** Относительная экспрессия генов *AOX* в темноте. Во вставке показана транскрипция *FDX5*-гена в темноте. Уровни кислорода в среде представлены в процентах по отношению к концентрации кислорода в среде в точке 0 часов, значение которой принимали за 100%.

Клетки, культивируемые в темноте, обычно испытывают недостаток кислорода. Измерение уровней растворенного кислорода в культуральной среде (Рис. 16). показало его снижение на 97% через 72 часа. О наступлении аноксии дополнительно свидетельствует индукция гена *FDX5*, кодирующего один из ферредоксинов хлоропласта и контролируемого недостатком кислорода в среде (Jacobs et al. 2009; Рис. 16. Вставка). Важно отметить, что при низких концентрациях кислорода (около 40%) профили экспрессии *FDX5* и *AOX2* коррелировали. Для дополнительной проверки того, действительно ли транскрипция *AOX2* регулируется недостатком кислорода в среде, были созданы условия, при которых аноксии достигалась в течении 1-6 часов (Рис. 17). Как видно через 3ч, когда происходило 33-кратное снижение кислорода (3%) , уровни транскрипции гена возрастали в 30 раз. Причем, в данных условиях не наблюдалось увеличения транскрипции второго гена - *AOX1*.



**Рис. 17.** Действие анокии на трнскрипцию *AOX*-генов. Во вставке показана транскрипция *FDX5*-гена в темноте. Уровни кислорода в среде представлены в процентах по отношению к концентрации кислорода в среде в точке 0 часов, значение которой принимали за 100%.

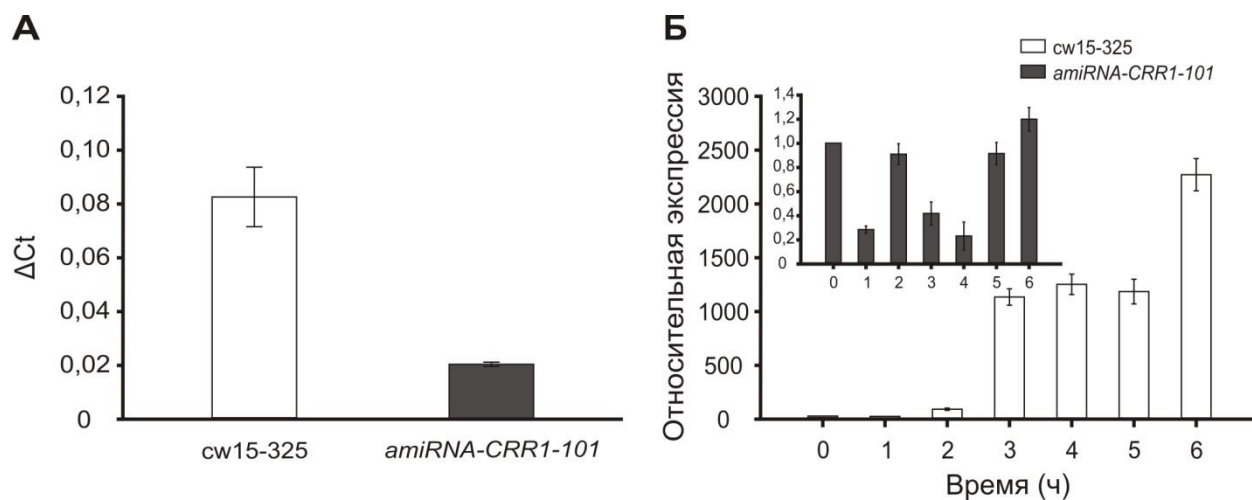
Т.о., в отличие от *AOX1*, ген *AOX2* контролируется не только в отсутствие света, но и низкими уровнями кислорода.

### 3.2.2. Роль транскрипционного фактора CRR1 в контроле транскрипции гена *AOX2*

В предыдущих исследованиях у *C. reinhardtii* был идентифицирован фактор транскрипции CRR1, который активирует ряд генов в условиях анокии (Hemschemeier et al., 2013), в том числе и *FDX5* (Lambertz et al., 2010). CRR1 связывается со специфическими цис-действующими последовательностями в промоторных областях - мотивами GTAC (Kropat et al., 2005). Промотор *AOX1* не содержит специфических мотивов для связывания CRR1. Однако, мы обнаружили, что промотор *AOX2* содержит мотив GTAC в положении «-36». Таким образом, было выдвинуто предположение, что CRR1 может участвовать в контроле транскрипции гена *AOX2* в условиях анаэробноза.

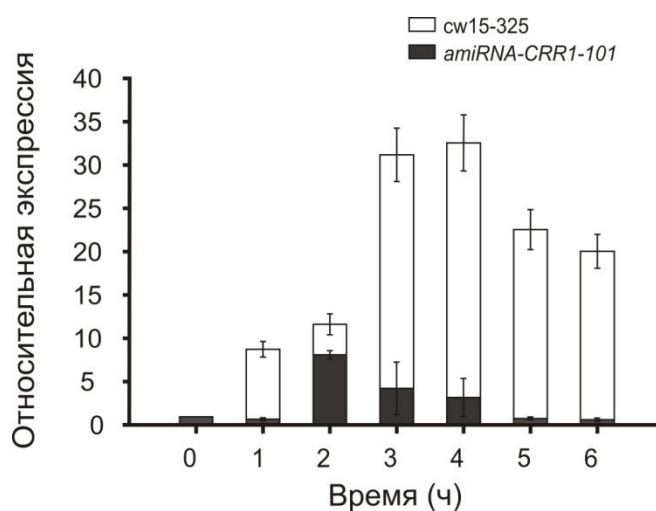
Для оценки потенциальной роли CRR1 в индуцированной гипоксией экспрессии *AOX2*, с помощью метода экспрессии искусственны микроРНК был получен штамм со сниженным уровнем мРНК CRR1 -*amiRNACRR1-101* (Рис. 18 А). Для доказательства эффективности снижения уровней самого белка, была проанализирована транскрипция контрольного гена *FDX5* в условиях гипоксии. (Рис. 18 Б). Как видно из представленных данных, у штамма *amiRNACRR1-101* не происходило увеличения транскрипции *FDX5* при

снижении содержания кислорода в среде.



**Рис. 18.** Характеристика штамма *amiRNACRR1-101*. (А) Относительные уровни транскрипции *CRR1* у исходного штамма cw15-325 и трансформанта *amiRNACRR1-101*. (Б) – относительная экспрессия *FDX5* у штаммов cw15-325 и *amiRNACRR1-101* в условиях аноксии.

Уровень транскрипции *AOX2* (Рис. 19) в трансформанте был ниже, чем в исходном штамме, но, и в отличие от *FDX5* (Рис. 18 Б), некоторая индукция была зафиксирована. Не исключено, что наблюдаемое увеличение транскрипции *AOX2* в трансформанте может быть обусловлено невыявленными пока сигналами, опосредованными темнотой.

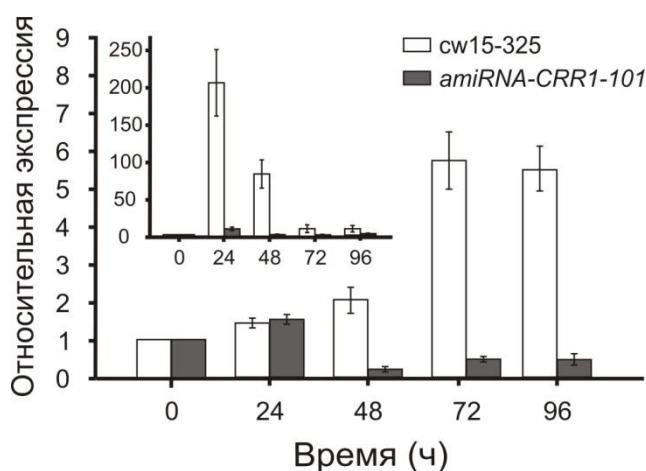


**Рис. 19.** Уровни относительной экспрессии *AOX2* у штаммов cw15-325 и *amiRNACRR1-101* в условиях аноксии.

Известно, что у *C. reinhardtii* аноксия может достигаться путем помещения клеток



на свету в среду, не содержащую серу (Melis et al., 2000; Nguyen et al., 2008). У клеток, испытывающих недостаток по сере, нарушаются процессы фотосинтеза и изменяется метаболизм, в частности они начинают продуцировать  $H_2$ . Скорость потребления  $O_2$  в процессе дыхания превышает образование его в ходе фотосинтеза, что в результате способствует созданию аноксии. В условиях «световой аноксии» в клетках исходного штамма наблюдалось увеличение уровней транскрипции *AOX2* в 2-6 раз, тогда как в трансформанте возрастания транскриптов не происходило (Рис. 20). Сходная закономерность фиксировалась и при анализе контрольного гена *FDX5* (Рис. 20. Вставка).

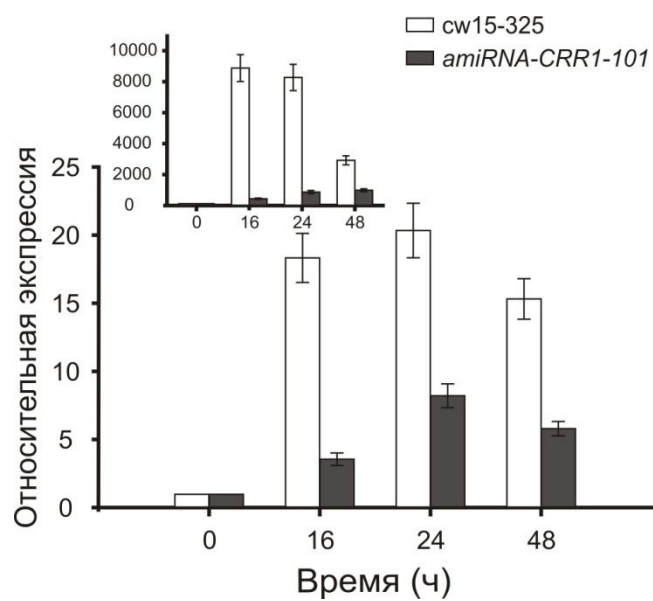


**Рис. 20.** Действие аноксии в присутствии света на относительную экспрессию *AOX2*. Культуры, выращенные в стандартных условиях, переносили в среду, не содержащую серу. Во вставке представлена экспрессия гена *FDX5*.

### 3.2.3. Действие дефицита меди на транскрипцию гена *AOX2*

Ранее было установлено, что *CRR1* участвует в регуляции транскрипции нескольких генов в условиях дефицита *Cu* в культуральной среде (Lambertz et al., 2010; Quinn et al., 2000; 2002). Далее было проверено, способен ли *CRR1* контролировать транскрипцию *AOX2* в условиях дефицита *Cu* на свету (Рис. 21). В качестве положительного контроля действия дефицита *Cu* проверяли уровень транскрипции *FDX5* (Lambertz et al., 2010) (Рис. 21. Вставка).

17-кратное увеличение транскрипции *AOX2* у исходного штамма *cw15-325* фиксировалась через 16 часов после инкубирования клеток в среде, не содержащей *Cu*. Максимальное 20-кратное увеличение транскрипции наблюдалось через 24 часа. При культивировании клеток *amiRNA-CRR1-101* в среде без *Cu*, уровень экспрессии *AOX2* был в среднем в 2,5-3,3 раза меньше, чем в штамме *cw15-325*.



**Рис. 21.** Влияние дефицита Си на относительную экспрессию гена *AOX2*. Во вставке представлена экспрессия гена *FDX5*.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1. Синтез и функционирование альтернативной оксидазы АОХ1 в условиях стрессового воздействия кадмия

Не смотря на то, что адаптация растений на стрессовое действие кадмия, достаточно хорошо изучена (Andresen and Küpper, 2013; Chmielowska-Bak et al., 2014; Keunen et al., 2011; 2015; 2016; Verbruggen et al., 2009), роль митохондрий в этом процессе практически не исследовалась. У высших растений АОХ рассматривается как важный компонент защитной реакции митохондрий на стрессы разной природы (Vanlerberghe, 2013). У *C. reinhardtii* была выявлена роль АОХ1 в адаптации клеток к росту на нитрате в качестве источника азота, а также показано увеличение экспрессии АОХ1 в условиях холодового, теплового и окислительного стрессов (Molen et al., 2006; Zalutskaya et al., 2015). Нами установлено, что в условиях темноты кадмий индуцирует увеличение уровней транскрипции *AOX1* и синтеза белка (Рис. 9, Рис. 10, Рис. 11). Как и в случае с *Euglena* (Castro-Guerrero et al., 2008), у *C. reinhardtii* наблюдается значительное возрастание доли альтернативного дыхания в ответ на действие кадмия в темноте (Рис. 12). Следует отметить, что Cd-индуцированная активация транскрипции *AOX*, последующая трансляция белка и активация альтернативного пути дыхания в клетках, культивируемых на свету ниже, чем в темноте. (Рис. 10, Рис. 11 Б, Рис. 12 Б). Это может быть связано с аддитивностью сигналов, которые запускаются присутствием кадмия и формируются в темноте.

В настоящее время принято считать, что АФК, и особенно  $H_2O_2$ , играют ключевую роль во внутриклеточных сигнальных путях и регуляции генной экспрессии во многих организмах, включая растения (Mittler et al., 2011; Wrzaczek et al., 2013). У высших растения кадмий способен вызывать окислительный стресс, который приводит к активации нескольких антиоксидантных ферментов (Garnier et al., 2006; Gallego et al., 2012; Chmielowska-Bak et al., 2014). В клетках *C. reinhardtii* под воздействие кадмия также увеличивают концентрации АФК (Aksmann et al., 2014). Следовательно, в клетках, подвергнутых действию кадмия, *AOX1* может регулироваться сигналами, связанными с окислительный стрессом. В растительных клетках при разных стрессовых условиях существуют разные пути для генерации  $H_2O_2$  (Wiczarz et al., 2015). Согласно нашим данным, в освещенных клетках, подвергнутых воздействию кадмия, концентрация внутриклеточной  $H_2O_2$  выше, чем в клетках, адаптированных к темноте (Рис. 13). При воздействии кадмия на клетки *C. reinhardtii* несколько ферментов, вовлеченных в детоксикацию  $H_2O_2$ , такие как каталаза и супероксиддисмутаза, активируются на уровнях

транскрипции гена и активности фермента (Aksmann et al., 2014). Кроме того, контролируемое снижение активности каталазы происходит при переносе клеток из темноты на свет (Shao et al., 2008). Нами было установлено, что активность каталазы в клетках, инкубированных в темноте в течение 4 часов в присутствии кадмия, значительно выше, чем в освещенных клетках (Рис. 14). Полученные данные предполагают, что каталаза ответственна за низкий уровень  $H_2O_2$ , который фиксировался в клетках, подвергшимся воздействию кадмия и инкубированных в темноте (Рис. 13). В целом полученные нами результаты указывают на отсутствие прямой связи между уровнями мРНК *AOX1* и концентрацией  $H_2O_2$  в клетках *C. reinhardtii*, инкубированных в присутствии кадмия. Мы предполагаем, что для контроля синтеза *AOX1* при стрессовом действии кадмия необходим невыявленный пока ( $H_2O_2$ -независимый) механизм. Кроме того, по нашим данным, сигналы, опосредованные темнотой, могут функционировать совместно с Cd-опосредованными сигналами, и, таким образом, вероятно, регулируют экспрессию *AOX1* в аддитивной манере.

#### 4.2. Регуляция экспрессии *AOX2* в стрессовых условиях

На протяжении длительного времени существовало мнение о том, что экспрессия генов подсемейства *AOX2* носит конститутивный характер (Dinant et al., 2001). Однако, появились некоторые данные, которые позволяют пересмотреть взгляд на регуляцию и функции *AOX2*-белков (Clifton et al. 2005, 2006, Costa et al. 2010, Cavalcanti et al. 2013). По нашим данным у *C. reinhardtii* транскрипция *AOX2* индуцируется в ответ на воздействие темноты (Рис. 16, Рис. 17). Положительная регуляция обоих генов *AOX* сигналами, опосредованными темнотой, может отражать повышенную необходимость в альтернативном пути дыхания в условиях отсутствия света.

Кроме того, нами впервые установлено, что в условиях гипоксии, уровень экспрессии *AOX2* возрастает (Рис. 16, Рис. 17). Данные результаты указывают на прямую зависимость активации транскрипции *AOX2* от снижения уровней кислорода в среде. Известно, что у одноклеточной зеленой водоросли более 500 генов положительно регулируются в процессе адаптации клеток под действием гипоксии (Mus et al., 2007). Адаптация к условиям гипо- и аноксии имеет для фотосинтезирующих организмов особое значение, так как в течение ночи из-за прекращения функционирования фотосинтетического аппарата и активного дыхания концентрация кислорода в среде постепенно снижается, что особенно важно для водных и почвенных микроорганизмов, к которым относится и *C. reinhardtii*.

Известно, что ключевой регулятор транскрипции нескольких десятков генов у *C. reinhardtii* в условиях гипо/аноксии является транскрипционный фактор CRR1 (Hemschemeier et al., 2013). Промотор *AOX2* содержит потенциальный мотив для связывания CRR1. На основе анализа полученного в работе штамма *amiRNACRR1-101* со сниженным уровнем CRR1, было установлено, что ген *AOX2* находится под контролем регулятора в условиях аноксии (Рис. 18, Рис. 19). Кроме того, при удалении серы из среды («световая аноксия») индукция *AOX2* также контролировалась транскрипционным фактором CRR1 (Рис. 20). Важно отметить, что в данных условиях профили экспрессии *AOX2* и *FDX5* в течение времени существенно различались (Рис. 20 Вставка). Поскольку аноксия в среде без серы сопровождается также существенными изменениями в метаболизме, то не исключено, что эти изменения, могут влиять на экспрессию *AOX2* и *FDX5*, кодирующих митохондриальный и хлоропластный белки по-разному.

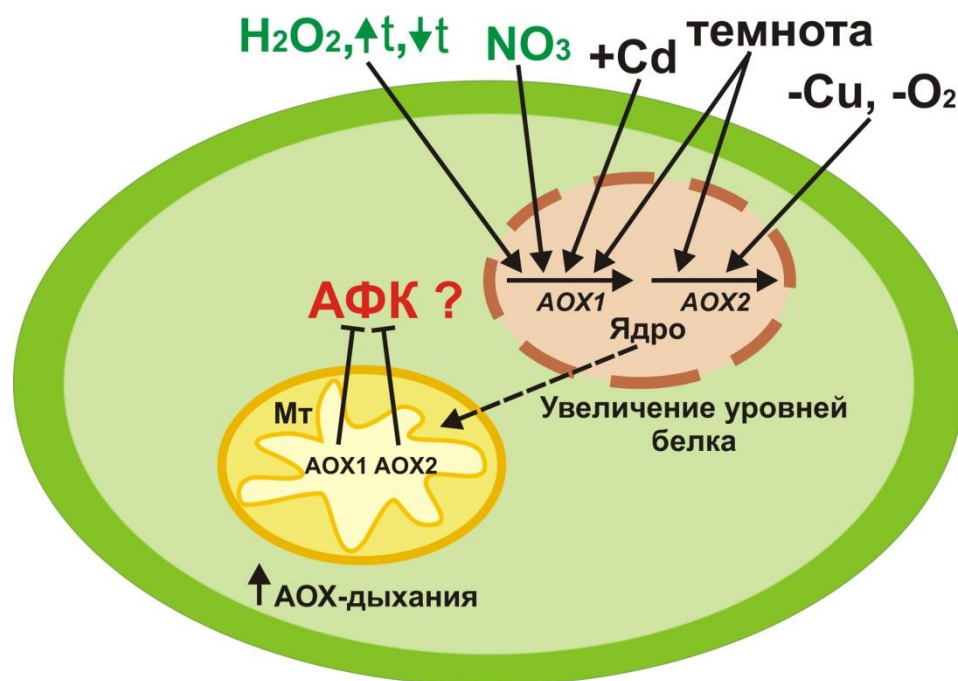
Известно, что в клетках *C. reinhardtii* транскрипция нескольких генов, индуцированная в ответ на отсутствие кислорода в среде, также активируется в условиях отсутствия меди (Castruita et al., 2011). Ген *AOX2* также положительно регулируется дефицитом меди на уровне транскрипции с участием CRR1 (Рис. 21). Вместе с тем, сохранение некоторого увеличения *AOX2*-транскриптов в трансформанте *amiRNACRR1-101* в среде без меди предполагает функционирование дополнительного (CRR1-независимого) механизма регуляции гена *AOX2*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ регуляции альтернативных оксидаз *C. reinhardtii* в стрессовых условиях позволил прийти к следующему заключению.

При действии на клетки *C. reinhardtii* токсичных для них концентраций кадмия происходило увеличение не только уровней транскрипции *AOX1* гена и уровней белка AOX1, но и возрастала доля альтернативного дыхания, как защитного ответа на увеличение активных форм кислорода (Zalutskaya et al. (2016) Env Exp Bot). Кроме того, нами впервые установлена индукция гена *AOX1* при адаптации клеток к росту в темноте, и доказано, что сигналы, опосредуемые темнотой, функционируют в аддитивной манере с сигналами, индуцируемыми действием кадмия. Полученные данные позволяют расширить наши представления о стрессовых условиях, которые обуславливают увеличение AOX-зависимого дыхания и приводят к возрастанию уровней альтернативной оксидазы AOX1 в клетках *C. reinhardtii*.

Впервые показана индукция гена, кодирующего альтернативную оксидазу из второго подсемейства - AOX2, в условиях гипоксии и дефицита меди; контроль транскрипции находится под контролем транскрипционного фактора CRR1 (Ostroukhova et al. (2017) European Journal of Protistology). Полученные данные позволяют пересмотреть существующую ранее парадигму о белках семейства AOX2, как конститутивно синтезируемых и не вовлеченных в ответы на действие стрессоров. По нашему мнению, альтернативные оксидазы могут представлять собой один из ключевых компонентов ответов микроорганизма на стрессовые воздействия наряду с охарактеризованной ранее ролью AOX1 в адаптации клеток к росту на нитрате в качестве источника азота (Рис. 22). Процессы, которые контролируются альтернативными оксидазами *C. reinhardtii* при стрессовых воздействиях, могут быть шире, чем известно в настоящее время. На основе анализа штаммов со сниженными уровнями AOX1 и AOX2 в дальнейшей работе предполагается проверить гипотезу о том, что процессы, которые контролируются альтернативными оксидазами *C. reinhardtii* при стрессовых воздействиях, могут быть шире, чем известно в настоящее время.



**Рис. 22.** Схема, показывающая факторы, которые влияют на транскрипцию *АОХ*-генов. Зеленым выделены факторы, выявленные в работе коллег.

## ВЫВОДЫ

1. Экспрессия гена *AOX1* индуцируется действием кадмия, что приводит к увеличению уровней мРНК и белка, и возрастанию доли альтернативного дыхания.
2. Отсутствие света приводит к увеличению транскрипции генов *AOX1* и *AOX2*.
3. Экспрессия гена *AOX2* положительно контролируется гипоксией и удалением меди из среды.
4. В контроль транскрипции *AOX2*-гена в условиях гипоксии и дефицита меди вовлечен регуляторный белок CRR1.



## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность научному руководителю Елене Викторовне Ермиловой за возможность проведения экспериментальных исследований в лаборатории адаптации микроорганизмов, а также за неоценимую помощь на всех этапах выполнения работы.

Искреннюю признательность выражаю старшим научным сотрудникам лаборатории адаптации микроорганизмов – Залуцкой Жаннете Михайловне и Лапиной Татьяне Викторовне и инженеру-исследователю Минаевой Екатерине Сергеевне за оказаную мне помощь в выполнении экспериментальной части работы.

Благодарю заведующего кафедры микробиологии Санкт-Петербургского государственного Александра Васильевича Пиневица за предложенную мне возможность проводить научную работу в лаборатории адаптации микроорганизмов под руководством Елены Викторовны Ермиловой.

Благодарность выражаю сотрудникам ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета за возможность выполнения части экспериментов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Method Enzym.* 105, 121–126.
2. Aksmann, A., Pokora, W., Bascik-Remisiewicz, A., Dettlaff-Pokora, A., Wielgomas, B., Dziadziuszko, M., Tukaj, Z., 2014. Time-dependent changes in antioxidative enzyme expression and photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* cells under acute exposure to cadmium and anthracene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 31–40.
3. Amirsadeghi, S., Robson, C.A., Vanlerberghe, G.C., 2007. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress. *Physiol Plant.* 129, 253–266.
4. Andersson, M. E., Nordlund, P., 1999. A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett.* 449, 17–22.
5. Andresen, E., Küpper, H., 2013. Cadmium toxicity in plants. *Met. Ions Life. Sci.* 11, 395–413.
6. Armstrong, A.F., Badger, M.R., Day, D.A., Barthet, M.M., Smith, P.M.C., Millar, A.H., Whelan, J., Atkin, O.K., 2008. Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration. *Plant Cell Environ.* 31, 1156–1169.
7. Baurain, D., Dinant, M., Coosemans, N., Matagne, R.F., 2003. Regulation of the alternative oxidase *AOX1* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: Role of the nitrogen source on the expression of a reporter gene under the control of the *AOX1* promoter. *Plant Physiol.* 131, 1418–1430.
8. Berthold, D., A., Andersson, M. E., Nordlund, P., 2000. New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1460, 241–254.
9. Brown, G. C., Borutaite, V., 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life.* 52, 189–195.
10. Campos, M. D., Cardoso, H. G., Linke, B., Costa, J. H., Fernandes de Melo, D., Justo, L., Frederico, A. M., Arnholdt-Schmitt, B., 2009. Differential expression and co-regulation of carrot *AOX* genes (*Daucus carota*). *Physiol Plant.* 137, 78–91.
11. Castro-Guerrero, N.A., Rodríguez-Zavala, J.S., Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R., 2008. Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under  $\text{Cd}^{2+}$  stress in *Euglena*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 227–235.
12. Castruita, M., Casero, D., Karpowicz, S.J., Kropat, J., Vieler, A., Hsieh, S.I., Yan, W., Cokus, S., Loo, J.A., Benning, C., Pellegrini, M., Merchant, S.S., 2011. Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. *Plant Cell* 23, 1273–1292.

13. Cavalcanti, J.H., Oliveira, G.M., Saraiva, K.D., Torquato, J.P., Maia, I.G., de Melo, D.F., Costa, J.H., 2013. Identification of duplicated and stress-inducible Aox2b gene co-expressed with Aox1 in species of the *Medicago* genus reveals a regulation linked to gene rearrangement in leguminous genomes. *Plant Physiol.* 170, 1609–1619.
14. Chmielowska-Bak, J., Gzyl J., Rucinska-Sobkowiak, R., Arasimowicz-Jelonek, M., Deckert, J., 2014. The new insights into cadmium sensing. *Front. Plant Sci.* 5, 245.
15. Clifton, R., Harvey Millar, A., Whelan, J., 2006. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757, 730–741.
16. Clifton, R., Lister, R., Parker, K.L., Sappl, P.G., Elhafez, D., Millar, A.H., Day, D.A., Whelan, J., 2005. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 58, 193–212.
17. Considine, M. J., Holtzapffel, R. C., Day, D. A., Whelan, J., Millar, A. H., 2002. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.* 129, 949–953.
18. Costa, J. H., Cardoso, H. G., Campos, M. D., Zavattieri, A., Frederico, A. M., Fernandes de Melo, D., Arnholdt-Schmitt, B., 2009a. *Daucus carota* L. – an old model for cell reprogramming gains new importance through a novel expansion pattern of alternative oxidase (AOX) genes. *Plant Physiol Biochem.* 47, 753–759.
19. Costa, J. H., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Pham-Thi, A., da Guia Silva Lima, M., Dizengremel, P., Jolivel, Y., de Melo, D., 2004. Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes 2a and 2b. *Plant Sci.* 167, 233–239.
20. Costa, J.H., Mota, E.F., Cambursano, M.V., Lauxmann, M.A., de Oliveira, L.M., Silva Lima Mda, G., Orellano, E.G., Fernandes de Melo, D., 2010. Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (*VuAOX1* and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol.* 167, 561–570.
21. Crutchfield, A. L. M., Diller. K. R., Brand, J. J., 1999. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Eur J Phys.* 34 (1), 43-52.
22. Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Ravindran Nair, A., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K., 2010. Cadmium stress. An oxidative challenge. *Biol. Met.* 23, 927–940.
23. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze', D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life*

Sci. 57, 779–795.

24. Derzaph, T. L. M., Weger, H. G., 1996. Immunological identification of the alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). J Phycol. 32, 621–623.
25. Dinant, M., Baurain, D., Coosemans, N., Joris, B., Matagne, R.F., 2001. Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. Curr. Genet. 39, 101–108.
26. Ederli, L., Morettini, R., Borgogni, A., Wasternack, C., Miersch, O., Reale, L., Ferranti, F., et al., 2006. Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. Plant Physiol. 142, 595– 608.
27. Elthon, T. E., McIntosh, L., 1986. Characterization and Solubilization of the Alternative Oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. Plant physiology. 82, 1–6.
28. Elthon, T. E., McIntosh, L., 1987. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84, 8399–8403.
29. Elthon, T. E., Nickels, R. L., McIntosh, L., 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. Plant physiology. 89, 1311–1317.
30. Ferrante, P., Catalanotti, C., Bonente, G., Giuliano, G., 2008. An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. PLoS One 3, e3200, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003200>.
31. Fiorani, F., Umbach, A.L., Siedow, J.N., 2005. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis AOX1a* transgenic plants. Plant Physiol. 139, 1795–1805.
32. Frederico, A.M., Campos, M.D., Cardoso, H.G., Imani, J., and Arnholdt-Schmitt, B., 2009. Alternative oxidase involvement in *Daucus carota* somatic embryogenesis, Physiologia Plantarum. 137, 498–508.
33. Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M., 2000. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. Plant Cell. 12, 393–404.
34. Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., et al., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. Environ. Exp. Bot. 83, 33–46.
35. Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, J.P., Blein, J.P., Ranjeva, R., Montillet, J.L., 2006. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. Plant Cell Environ. 29, 1956–1969.

36. Gérin, S., Mathy, G., Blomme, A., Franck, F., Sluse, F. E., 2010. Plasticity of the mitoproteome to nitrogen sources (nitrate and ammonium) in *Chlamydomonas reinhardtii*: The logic of *Aox1* gene localization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797, 994–1003.
37. Gillet, S., Decottignies, P., Chardonnet, S., Le Maréchal, P., 2006. Cadmium response and redox in targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. *Photosynth. Res.* 89, 201–211.
38. Gonzàlez-Meler, M.A., Ribas-Carbo, M., Giles, L., Siedow, J.N., 1999. The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol.* 120, 765–772.
39. Gorman, D.S., Levine, R.P., 1965. Cytochrome and plastocyanin, their sequences in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 1665–1669.
40. Gupta, K. J., Shah, J. K., Brotman, Y., Jahnke, K., Willmitzer, L., Kaiser, W. M., Bauwe, H., Igamberdiev, A. U., 2012. Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *J. Exp. Bot.* 63, 1773–1784.
41. Hanqing Feng, Dongdong Guan, Kun Sun, Yifeng Wang, Tengguo Zhang, Rongfang Wang. 2013. Expression and signal regulation of the alternative oxidase genes under abiotic stresses. *Acta Biochim Biophys Sin* 45 (12), 985-994.
42. Hemschemeier, A., Casero, D., Liu, B., Benning, C., Pellegrini, M., Happe, T., Merchant, S., 2013. Copper response regulator1-dependent and -independent responses of the *Chlamydomonas reinhardtii* transcriptome to dark anoxia. *Plant Cell* 25, 3186–3211.
43. Hemschemeier, A., Melis, A., Happe, T., 2009. Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynth. Res.* 102, 523–526.
44. Heyno, E., Klose, C., Krieger-Liszkay, A., 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytol.* 179, 687–699.
45. Ho, L.H.M., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Thirkettle-Watts, D., Van Aken, O., Whelan, J., 2008. Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147, 1858–1873.
46. Huang, X., Von-Rad, U., Durner, J., 2002. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cell. *Planta.* 215, 914–923.

47. Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M. S., Moore, A. L., 2011. Identification of a gene for pyruvate-insensitive mitochondrial alternative oxidase expressed in the thermogenic appendices in *Arum maculatum*. *Plant physiology*. 157, 1721–1732.
48. Ito, Y., Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N., Hirai, A., 1997. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene*. 203, 121–129.
49. Jacobs, J., Pudollek, S., Hemschemeier, A., Happe, T., 2009. A novel, anaerobically induced ferredoxin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*. 583, 325–329.
50. Johnson, C., Boden, E., Arias, J., 2003. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 15: 1846–1858,
51. Juszczuk, I. M., Rychter, A. M., 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*. 50 (4), 1257-1271.
52. Keunen, E., Remans, T., Bohler, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2011. Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *Int. J. Mol. Sci*. 12, 6894–6918.
53. Kim, J., Kim, H. Y., 2006. Functional analysis of a calcium-binding transcription factor involved in plant salt stress signaling. *FEBS Lett*. 580, 5251–5256.
54. Kindle, K. L., 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1228–1232.
55. Kindle, K. L., 1998. Nuclear transformation: technology and applications. In JD Rochaix, M Goldschmidt-Clermont, S Merchant, eds, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 41–61.
56. Kirimura, K., et Yoda, M., Ko, I., Oshida, Y., Miyake, K., Usami, S., 1999. Cloning and sequencing of the chromosomal DNA and cDNA encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus niger* WU-2223L. *J Biosci Bioeng*. 88 (3), 237-43.
57. Kropat, J., Tottey, S., Birkenbihl, R.P., Depège, N., Huijser, P., Merchant, S., 2005. A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18730–18735.
58. Ku, H. S., Leopold, A. C., 1970. Mitochondrial responses to ethylene and other hydrocarbons. *Plant Physiol*. 46, 842–844.
59. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
60. Lambertz, C., Hemschemeier, A., Happe, T., 2010. Anaerobic expression of the ferredoxin-encoding FDX5 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* is regulated by the Crr1 transcription factor. *Eukaryot. Cell* 9, 1747–1754.
  61. Li, Z., Xing, D., 2011. Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminum phytotoxicity using fluorescence techniques. *J. Exp. Bot.* 62, 331–343.
  62. Marti, M. C., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Ribas-Carbó, M., Lázaro, J. J., Sevilla, F., Jiménez, A., 2011. Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum*, L.) leaves. *J. Exp. Bot.* 62, 3863–3874.
  63. Maxwell, D. P., Nickels, R., McIntosh, L., 2002. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant. J.* 29, 269–279.
  64. McCabe, T. C., Finnegan, P. M., Harvey Millar, A., Day, D. A., Whelan, J., 1998. Differential expression of alternative oxidase genes in soybean cotyledons during postgerminative development. *Plant Physiol.* 118, 675–682.
  65. McDonald, A. E., Vanlerberghe, G. C., 2006. Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D* 1, 357–364.
  66. McIntosh, L., 1994. Molecular Biology of the Alternative Oxidase. *Plant Physiol.* 105, 781-786.
  67. Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y., Akimenko, V. K., 1999. Regulation and physiological role of cyanide-resistant oxidases in fungi and plants. *Biochemistry.* 64, 1230–1243.
  68. Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L., Seibert, M., 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 122, 127–136.
  69. Millar, A.H., Bergersen, F.J., Day, D.A., 1994. Oxygen affinity of terminal oxidases in soybean mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* 32, 847–852.
  70. Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F., 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300-309.
  71. Molen, T.A., Rosso, D., Piercy, S., Maxwell, D.P., 2006. Characterization of the alternative oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* in response to oxidative stress and a

- shift in nitrogen source. *Physiol. Plant.* 127, 74–86.
72. Molnar, A., Basset, A., Thuenemann, E., Schwach, F., Karkare, S., Ossowski, S., Weigel, D., Baulcombe, D., 2009. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 58, 165–174.
  73. Murakami, Y., Toriyama, K., 2008. Enhanced high temperature tolerance in transgenic rice seedlings with elevated levels of alternative oxidase, OsAOX1a. *Plant Biotechnol.* 25, 361–364.
  74. Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M.C., Grossman, A.R., 2007. Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 25475–25486.
  75. Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., Hancock, J. T., 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot.* 53, 1237–1247.
  76. Neimanis, K., Staples, J. F., Hüner, N. P., and McDonald, A. E., 2013. Identification, expression, and taxonomic distribution of alternative oxidases in non-angiosperm plants. *Gene.* 526, 275–286.
  77. Nguyen, A.V., Thomas-Hall, S.R., Malno, A., Timmins, M., Mussnug, J.H., Rupprecht, J., Kruse, O., Hankamer, B., Schenk, P.M., 2008. Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 7, 1965–1979.
  78. Norman, C., Howell, K. A., Millar, A. H., Whelan, J. M., Day, D. A., 2004. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* 134, 492–501.
  79. Ostroukhova, M., Zalutskaya, Z., Ermilova, E., 2017. New insights into AOX2 transcriptional regulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Protistology.* 58, 1-8.
  80. Pádua, M., Aubert, S., Casimiro, A., Bligny, R., Millar, A.H., Day, D.A., 1999. Induction of alternative oxidase by excess copper in sycamore cell suspensions. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 131–137.
  81. Parsons, H.L., Yip, J.Y.H., Vanlerberghe, G.C., 1999. Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. *Plant Physiol.* 121, 1309–1320.
  82. Polidoros, A.N., Mylona P.V., Arnholdt-Schmitt, 2009. Aoxgene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiologia Plantarum.* 137, 342-353.
  83. Popov, N. [Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue



- homogenates] / Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S., Matthies, H., 1975. *Acta Biol Med Ger.* 34, 1441-1446.
84. Quesada, A., Galvan, A., Schnell, R.A., Lefebvre, P.A., Fernandes, E., 1993. Five nitrate assimilation-related loci are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* 240, 387–394.
  85. Quinn, J.M., Barraco, P., Eriksson, M., Merchant, S., 2000. Coordinate copper- and oxygen-responsive Cyc6 and Cpx1 expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *J. Biol. Chem.* 275, 6080–6089.
  86. Quinn, J.M., Eriksson, M., Moseley, J.L., Merchant, S., 2002. Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiol.* 128, 463–471.
  87. Rachmilevitch, S., Xu, Y., Gonzalez-Meler, M.A., Huang, B., Lambers, H., 2007. Cytochrome and alternative pathway activity in roots of thermal and non-thermal *Agrostis* species in response to high soil temperature. *Physiol. Plant.* 129, 163–174.
  88. Rentel, M. C., Knight, M. R., 2004. Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 1471–1479.
  89. Rhoads, D. M., McIntosh, L., 1993. Cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. Effects of salicylic acid. *Plant Physiol.* 103, 877–883.
  90. Rhoads, D.M., Subbaiah, C.C., 2007. Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* 7, 177–194.
  91. Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., Siedow, J.N., 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.* 141, 357–366.
  92. Saisho, D., Nakazono, M., Lee, K.H., Tsutsumi, N., Akita, S., Hirai, A., 2001a. The gene for alternative oxidase-2 (AOX2) from *Arabidopsis thaliana* consists of five exons unlike other AOX genes and is transcribed at an early stage during germination. *Genes Genet. Syst.* 76, 89–97.
  93. Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N., Hirai, A., 2001b. ATP synthesis inhibitors as well as respiratory inhibitors increase steady-state level of alternative oxidase mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol.* 158, 241–245.
  94. Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A., Nakazono, M., 1997. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 35, 585–596.
  95. Sakihama, Y., Nakamura, S., Yamasaki, H., 2002. Nitric oxide production mediated by

- nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms, *Plant Cell Physiol.* 43 (3), 290–297.
96. Shao, N., Beck, C.F., Lemaire, S.D., Krieger-Liszkay, A., 2008. Photosynthetic electron flow affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling by inactivation of catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 228, 1055–1066.
  97. Siedow, J. N., Umbach, A. L., Moore, A. L., 1995. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett.* 362, 10–14.
  98. Smith, C. A., Melino, V. J., Sweetman, C., Soole, K. L., 2009. Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum.* 137, 459–472.
  99. Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., et al., 2011. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23, 1000–1013.
  100. Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U. C., Teige, M., 2012. Plant calcium signaling: an emerging field. *J Exp Bot.* 63, 1525–1542.
  101. Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., Dolan, L., 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science.* 319, 1241–1244.
  102. Theodorou, M.E., Plaxton, W.C., 1993. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 101, 339–344.
  103. Umbach, A. L., Siedow, J. N., 2000. Covalent and Noncovalent Dimers of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase Protein in Higher Plant Mitochondria and Their Relationship to Enzyme Activity. *Plant physiology.* 103, 845–854.
  104. Vanlerberghe, G.C., 1997. Alternative oxidase: From Gene to Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 703–34.
  105. Vanlerberghe, G.C., 2013. Alternative oxidase, a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6805–6847.
  106. Vishwakarma, A., Tetali, S.D., Selinski, J., Scheibe, R., Padmasree, K., 2015. Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 116, 555–569.
  107. Wang, J., Rajakulendran, N., Amirsadeghi, S., Vanlerberghe, G.C., 2011. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold

- temperature. *Physiol. Plant.* 142, 339–351.
108. Watanabe, C.K., Hachiya, T., Terashima, I., Noguchi, K., 2008. The lack of alternative oxidase at low temperature leads to a disruption of the balance in carbon and nitrogen metabolism, and to an up-regulation of antioxidant defense systems in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ.* 31, 1190–1202.
  109. Wiczarz, M., Gubernator, B., Kruk J., Niewiadomska, E., 2015. Enhanced chloroplastic generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stress-resistant *Thellungiella salsuginea* in comparison to *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 153, 467–476.
  110. Wrzaczek, M., Brosché, M., Kangasjärvi, J., 2013. ROS signaling loops - production, perception, regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 575-82.
  111. Xiong, L., Zhu, J. K., 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 25, 131– 139.
  112. Xu, M. J., Dong, J. F., 2008. Synergistic action between jasmonic acid and nitric oxide in inducing matrine accumulation of *Sophora flavescens* suspension cells. *J Integr Plant Biol.* 50, 92–101.
  113. Zalutskaya, Z., Lapina, T., Ermilova, E., 2015. The *Chlamydomonas reinhardtii* alternative oxidase 1 is regulated by heat stress. *Plant Physiol. Biochem.* 97, 229–234.
  114. Zalutskaya, Z., Ostroukhova, M., Ermilova, E., 2016. The *Chlamydomonas* alternative oxidase 1 is regulated by cadmium stress: new insights into control of expression. *Environ. Exp. Bot.* 130, 133–140.
  115. Zhang, D. W., Xu, F., Zhang, Z. W., Chen, Y.E., Du, J.B., Jia, S.D., Yuan, S., et al., 2010. Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Environ.* 33, 2121–2131.
  116. Zhang, L., Xing, D., 2008. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant Cell Physio.* 49, 1092–1111.
  117. Zsigmond, L., Szepesi, A., Tari, I., Rigó, G., Király, A., Szabados, L., 2012. Overexpression of the mitochondrial PPR40 gene improves salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* 182, 87–93.
  118. Зайцева, Л. Г., Овчинникова, Т. В., Гринкевич, В. А., 2000. Испорт белков в митохондриях. *Биоорганическая химия.* 26 (9), 643-661.
  119. Рогов, А. Г., Суханова, Е. И., Уральская, Л. А., Аливердиева, Д. А., Звягильская, Р. А., 2014. Альтернативная оксидаза: распространение, индукция, свойства, структура, регуляция, функции. *Успехи биологической химии.* 54, 413-456.